

Die Rolle des Transkriptionsfaktors AP-2 epsilon in Chondrozyten



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät III für Biologie und Vorklinische Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Stephan Niebler

aus

Regensburg

im Jahr 2014

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

20.03.2014

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Anja-Katrin Boßerhoff

Unterschrift:

Stephan Niebler

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand in der Zeit von Januar 2010 bis März 2014 unter Anleitung von *Frau Prof. Dr. Anja Katrin Boßerhoff* am Institut für Pathologie, Medizinische Fakultät der Universität Regensburg.

Mein spezieller Dank geht deshalb an *Frau Prof. Dr. Anja Katrin Boßerhoff* für die Möglichkeit, diese interessante Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu können. Besonders hervorzuheben sind ihre engagierte Betreuung und ihre allzeitige Bereitschaft für motivierende Diskussionen sowie unzählige praktische und theoretische Hilfestellungen. Vielen herzlichen Dank!

Außerdem möchte ich mich bei *Herrn Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter*, dem Leiter des Instituts für Pathologie der Universität Regensburg, für die Gelegenheit bedanken, an seinem Institut zu promovieren.

Herrn Prof. Dr. Klaus von der Mark und *Herrn Prof. Dr. Ernst Tamm* danke ich vielfach für die Übernahme der Mentorenschaften dieser Dissertation sowie für ihre Zeit und Bereitschaft, meine Arbeit durch mehrmalige Diskussionsrunden und hilfreiche Anregungen zu unterstützen.

Herrn Dr. Thomas Schubert sage ich herzlichen Dank für die kompetente Unterstützung bei der praktischen Durchführung des Osteoarthrose-Modells sowie für die anschließende diagnostische Auswertung.

Ein großes Dankeschön geht zudem an alle Kollegen in der Arbeitsgruppe Boßerhoff sowie an den Rest des Instituts für das angenehme Arbeitsklima und die stets gute und faire Zusammenarbeit. Dabei möchte ich an erster Stelle *Dr. Rainer Schmid* und *Dr. Silke Kuphal* nennen, die mich mit einem stets offenen Ohr für meine Anliegen und Probleme, seien es fachlicher oder privater Natur, sowie durch aufmunternde, humorvolle Gespräche unsäglich unterstützt haben. Danke, Rainer und Silke! Bei beiden bedanke ich mich darüber hinaus für das Korrekturlesen dieser Arbeit. *Martina Waeber* und *Simone Hofmeister* danke ich für die vielen professionell ausgeführten Paraffinschnitte und HE-Färbungen. Außerdem bedanke ich mich bei *David*, *Eva*, *Rainer*, *Silke*, *Steffi* und *Susi* sowie *Ben*, *Kathi* und *Rosi* für ihre Freundschaft und für unvergessliche Momente während und nach der Arbeit. Die Zeit mit Euch hat mir großen Spaß gemacht! Schließlich bedanke ich mich bei *Peter Karl* und *Herbert Gabler* für die gute Zusammenarbeit im Tierstall und für das Versorgen meiner Mäuse.

DANKSAGUNG

Am allermeisten möchte ich mich jedoch bei meiner *Familie* und meinen *Freunden* bedanken. Bei meinen *Eltern* und *Großeltern* dafür, dass sie immer an mich glauben, auch in schweren Zeiten zu mir halten und mich vor und während des Studiums finanziell enorm unterstützt haben. Nur durch Euch wurde diese Promotion überhaupt möglich. Vielen, vielen Dank für alles!

Und nicht zuletzt natürlich bei meiner Freundin *Christina*, meinem Bruder *Thiemo* und allen meinen restlichen *Freunden* für die ernstgemeinten Interessensbekundungen und die regelmäßigen Unternehmungen in der Freizeit. Ihr bereichert mein Leben jeden Tag. Danke!

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VIII
Zusammenfassung	XI
1 Einleitung	1
1.1 Struktureller Aufbau des Kniegelenks und des hyalinen Knorpels	1
1.2 Die Skelettentwicklung der Vertebraten	4
1.2.1 Die Chondrogenese	5
1.2.1.1 Prächondrozytäre, mesenchymale Kondensation	5
1.2.1.2 Chondrogene Differenzierung	6
1.2.2 Die enchondrale Ossifikation	7
1.2.2.1 Hypertrophie und Biomineralisation	7
1.2.2.2 Terminale Differenzierung, Vaskularisation und Ossifikation	8
1.2.3 Die Wachstumsfuge	8
1.3 Regulatoren der Chondrogenese und der enchondralen Ossifikation	10
1.3.1 Extrazelluläre Regulatoren	11
1.3.1.1 Parakrine und endokrine Signalmoleküle	11
1.3.1.2 Zelladhäsionsmoleküle	13
1.3.1.3 Physikalische Stimuli	14
1.3.2 Intrazelluläre Regulatoren - Transkriptionsfaktoren	16
1.3.2.1 SOX9, L-SOX5 und SOX6	16
1.3.2.2 RUNX2	17
1.3.2.3 AP-2 Familie und AP-2 ϵ	19
1.4 Pathogenese einer Osteoarthritis	23
1.5 Zielsetzung	27
2 Ergebnisse	28
2.1 Identifikation neuer Zielgene von AP-2 ϵ in humanen Chondrozyten	28
2.1.1 Positive Regulation von <i>CXCL1</i> durch AP-2 ϵ	28
2.1.2 Regulation der <i>COL2A1</i> Promotoraktivität durch AP-2 ϵ	34
2.2 Analyse der embryonalen Skelettentwicklung in der <i>Tfap2e</i> $-/-$ Maus	41
2.3 Induktion der AP-2 ϵ Expression durch Hypoxie	45
2.4 Verstärkte OA-Progression in <i>Tfap2e</i> <i>knockout</i> Mäusen	52
2.5 Erhöhte Grundexpression und -aktivität von Mmp13 im Knorpel der <i>Tfap2e</i> $-/-$ Mäuse	57

3	Diskussion.....	62
3.1	<i>CXCL1</i> und <i>COL2A1</i> als Zielgene von AP-2 ϵ in Chondrozyten.....	62
3.2	Der Verlust von AP-2 ϵ führt zu keinen prägnanten Anormalitäten während der murinen Skelettentwicklung	68
3.3	Hypoxie als Induktor der AP-2 ϵ Expression	71
3.4	AP-2 ϵ als Inhibitor der Mmp13 Expression im murinen Gelenkknorpel	74
4	Material	81
4.1	Allgemeine Materialien	81
4.2	Geräte und Software	83
4.3	Organismen.....	85
4.4	Zellen und Gewebeproben.....	86
4.5	Plasmide	86
4.6	Oligonukleotide und siRNAs	88
4.7	Antikörper.....	92
4.8	Medien, Antibiotika, Puffer und Lösungen	92
5	Methoden.....	100
5.1	Arbeiten mit Bakterien	100
5.1.1	Kultivierung von Bakterien	100
5.1.2	Transformation von Bakterien	100
5.1.3	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Mini und Midi Präparation)	101
5.2	Nukleinsäureanalytik.....	101
5.2.1	Isolation von genomischer DNA aus Zellen und murinem Gewebe.....	101
5.2.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	102
5.2.3	Gelelektrophorese von DNA	102
5.2.4	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	103
5.2.5	Restriktionsverdau von DNA.....	103
5.2.6	Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide (Ligation)	103
5.2.7	Mutagenese-PCR (<i>site-directed</i> Mutagenese)	104
5.2.8	Isolation von RNA aus Säugetierzellen und murinen Geweben.....	105
5.2.9	Reverse Transkription.....	106
5.2.10	Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)	107
5.2.11	Konzentrationsbestimmung von DNA bzw. RNA.....	108
5.2.12	Sequenzierung von Plasmid-DNA	108
5.2.13	<i>In situ</i> Hybridisierung	109
5.3	Proteinanalytik.....	111
5.3.1	Herstellung von Gesamtproteinextrakten	111

5.3.2	Herstellung von Kernproteinextrakten.....	111
5.3.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	112
5.3.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	112
5.3.5	Proteindetektion mittels Western Blot	113
5.3.6	<i>In vitro</i> Translation	113
5.3.7	Immunhistologie	114
5.4	Weitere molekularbiologische Methoden.....	115
5.4.1	Arbeiten mit Radioaktivität	115
5.4.2	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	117
5.4.3	Detektion von Glykosaminoglykanen (GAG) in Lösungen	118
5.4.4	MMP13 Aktivitäts-Assay	118
5.5	Zellkulturmethoden	118
5.5.1	Einfrieren und Auftauen von Zellen	118
5.5.2	Kultivierung von Zellen.....	119
5.5.3	Transiente Transfektion von Zellen mit Nukleinsäuren	119
5.5.4	Luziferase Reporter Gen Assay	120
5.5.5	Herstellung und Differenzierung von Zellaggregaten aus hMSC.....	120
5.5.6	Hydrostatische, <i>in vitro</i> Belastung von Zellaggregaten	121
5.5.7	Induktion hypoxischer Bedingungen mittels DP/DFX oder 1 % O ₂	121
5.6	Arbeiten mit Mäusen	122
5.6.1	Zucht- und Haltungsbedingungen.....	122
5.6.2	Genotypisierung von <i>Tfap2e</i> ^{-/-} und WT Mäusen bzw. Embryonen	122
5.6.3	Herstellung von Paraffinmaterial	123
5.6.4	Isolation von murinen Embryonen spezifischen Alters	123
5.6.5	<i>Micromass</i> -Kultivierung embryonaler, mesenchymaler Zellen.....	124
5.6.6	Isolation mesenchymaler Stammzellen aus murinem Knochenmark	125
5.6.7	<i>In vitro</i> Kultivierung von Hüftknorpel explantaten	125
5.6.8	Induktion einer Osteoarthritis in murinen Kniegelenken	126
5.7	Licht- und Transmissions-Elektronenmikroskopie	127
5.8	Statistik.....	127
6	Literaturverzeichnis	128
7	Eigene Publikationen.....	147

Abkürzungsverzeichnis

α -	anti
μ	Mikro (10^{-6})
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
A	Ampere oder auch Adenin
Abb.	Abbildung
ad.	addiere (auffüllen auf ein bestimmtes Volumen)
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalie-Virus (engl. <i>cytomegalovirus</i>)
cpm	Zählimpulse pro Minute (engl. <i>counts per minute</i>)
C-Terminus	Carboxy-Ende einer Polypeptidkette
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFX	Desferrioxamin
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMM	engl. <i>destabilization of the medial meniscus</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DP	2,2'-Dipyridyl
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaltag
ECM	Extrazelluläre Matrix (engl. <i>extracellular matrix</i>)
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
EMSA	engl. <i>electrophoretic mobility shift assay</i>
engl.	englisch
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

EtOH	Ethanol
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung (9,80665 m/s ²)
h	Stunde(n) (engl. <i>hour</i>)
H ₂ O	Wasser
HE	Hämatoxylin/Eosin
hMSC	engl. <i>human mesenchymal stem cells</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
HRE	engl. <i>hypoxia responsive element</i>
Hz	Hertz (1 s ⁻¹)
IgG	Immunglobulin der Klasse G
ITS	Insulin/Transferrin/Selenige Säure
k	Kilo (10 ³)
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
KOAc	Kaliumacetat
l	Liter
LB	Lysogeny Broth, Bakterienmedium
m	Meter oder auch Milli (10 ⁻³)
M	molar (Mol/l)
min	Minute(n)
mMSC	engl. <i>murine mesenchymal stem cells</i>
MPa	Megapascal (entspricht 10 bar)
mRNA	Boten RNA (engl. <i>messenger RNA</i>)
MW	Molekulargewicht
n	Nano (10 ⁻⁹)
N-Terminus	Amino-Ende einer Polypeptidkette
OA	Osteoarthritis
p	Piko (10 ⁻¹²)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
Poly(dI-dC)	engl. <i>Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) acid</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR (engl. <i>quantitative real time-PCR</i>)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription oder auch Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
siRNA	engl. <i>small interfering RNA</i>
SOC	Super Optimal Broth Bakterienmedium mit 20 mM Glukose
SV40	Affenvirus 40 (engl. <i>simian vacuolating virus 40</i>)
Std.	Standard
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBS	Tris-gepufferte Saline
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
tRNA	Transfer RNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumenverhältnis (engl. <i>volume per volume</i>)
w	Woche
w/v	Masse pro Volumen (engl. <i>weight per volume</i>)
WT	Wildtyp
WB	Western Blot
z.B.	zum Beispiel

Elemente, Aminosäuren, DNA-Basen und Nukleotide wurden nach den internationalen Regeln abgekürzt. Die Schreibweise von Genen und Proteinen richtet sich nach der Nomenklatur von NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Gängige Fachausdrücke aus dem Englischen wurden übernommen, wenn eine deutsche Entsprechung nicht existiert oder nicht gebräuchlich ist.

Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Dissertation ist die Analyse der Bedeutung des Transkriptionsfaktors AP-2 epsilon (AP-2 ϵ) in Chondrozyten. Auf diese Weise soll zum besseren Verständnis von molekularen Prozessen bei der Entwicklung und der Homöostase von Knorpelgewebe sowie bei der Entstehung einer Osteoarthritis beigetragen werden.

Anfängliche Studien unserer Arbeitsgruppe konnten die Expression von AP-2 ϵ in verschiedenen chondrozytären Zelltypen belegen. Allerdings gab es keine weiterreichenden Informationen über die Funktion von AP-2 ϵ in Knorpelzellen. Über einen *ChIP-on-Chip*-Ansatz konnte das Gen für das Chemokin CXCL1 als potentiell Zielgen von AP-2 ϵ in humanen Chondrozyten identifiziert werden. Dies wurde anhand einer detaillierten Studie des CXCL1 Promotors bestätigt. Über Reporter- und Mutagenese-Experimente konnte eine spezifische AP-2 Bindestelle im CXCL1 Promotor ausfindig gemacht werden, über welche AP-2 ϵ die Expression des Gens fördert. Die direkte Bindung von AP-2 ϵ an dieses Sequenzmotiv ließ sich über Gelshift-Versuche und eine Chromatin-Immunpräzipitation verifizieren. Umgekehrt konnte bei ähnlicher experimenteller Vorgehensweise eine inhibitorische Wirkung von AP-2 ϵ auf das Gen für Typ II Kollagen (*COL2A1*) festgestellt werden. Auch dies erfolgt über ein einzelnes Bindemotiv in der proximalen *COL2A1* Promotorsequenz. Es ließ sich also zeigen, dass AP-2 ϵ in humanen Chondrozyten die Transkriptionsrate von CXCL1 positiv und von *COL2A1* negativ moduliert.

Trotz dieser regulatorischen Funktionen haben adulte AP-2 ϵ defiziente Mäuse (*Tfap2e* $-/-$) keinen offensichtlich anormalen Phänotyp. Aus diesem Grund wurde im zweiten Teil dieser Arbeit die embryonale Skelettentwicklung der Tiere über *in situ* Hybridisierungen sowie über Differenzierung isolierter mesenchymaler Zellen im Detail untersucht. Hierbei war es das Ziel transiente Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp (WT) aufzudecken, welche Rückschlüsse bezüglich der Rolle von AP-2 ϵ bei der Knorpel- und Skelettentwicklung zulassen würden. Dabei ließen sich bei den *Tfap2e* $-/-$ Embryonen aber keine bis lediglich geringe Anomalitäten feststellen, was auf redundante Kompensationsmechanismen hinweist, die den Verlust von AP-2 ϵ ausgleichen. Nichtsdestotrotz konnte im Rahmen dieser Analyse gezeigt werden, dass AP-2 ϵ in WT Mäusen bereits in den frühen mesenchymalen Extremitätenknospen nachweisbar ist, aber das Expressionslevel noch weit unter dem von differenzierten Chondrozyten liegt.

Im Fokus der weiteren Arbeiten stand deshalb die Identifikation von regulatorischen Mechanismen, die für die Induktion der AP-2 ϵ Expression im Verlauf der Chondrozyten-differenzierung verantwortlich sind. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Expression

von AP-2 ϵ in Knorpelzellen durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 α gefördert wird. Dessen Aktivität ist wiederum stark von der relativen Sauerstoffkonzentration im Gewebe abhängig, was Hypoxie als potentiellen Induktor der AP-2 ϵ Expression auswies. Die Korrelation der AP-2 ϵ Expression mit der des Hypoxiemarkers Angptl4 sowie die Inkubation von Chondrozyten bei 1 % atmosphärischer Sauerstoffkonzentration und die Behandlung von Zellen mit den Hypoxie-simulierenden Eisenchelatoren DP bzw. DFX bestätigten dies.

Abschließend wurde der Einfluss von AP-2 ϵ auf die Homöostase sowie auf pathophysiologische Veränderung des adulten Gelenkknorpels untersucht. Dazu wurden *Tfap2e* $-/-$ und WT Mäuse einem Osteoarthrose-Modell unterzogen und die Progression der Erkrankung in beiden Genotypen verglichen. Interessanterweise konnte bei den AP-2 ϵ defizienten Mäusen eine signifikant verstärkte Ausprägung der Krankheit beobachtet werden. Über immunhistochemische Färbungen gegen *Cleaved Caspase 3* konnte ausgeschlossen werden, dass eine erhöhte Apoptoserate im Knorpel der *Tfap2e* $-/-$ Tiere kausal dafür verantwortlich ist. Überraschenderweise ließ sich hingegen eine deutlich erhöhte Grundexpression sowie -aktivität des katabolen Enzyms Mmp13 im artikulären Knorpel der *Tfap2e* $-/-$ Mäuse detektieren. Hieraus kann gefolgert werden, dass AP-2 ϵ die Expression von Mmp13 in artikulären Chondrozyten negativ reguliert und es deshalb nach einer Deletion des Transkriptionsfaktors zu einer Zunahme der Mmp13 Expression kommt. Sehr wahrscheinlich verschiebt sich hierdurch das physiologische Gleichgewicht aus Matrix-Degradation und -Neusynthese auf die katabole Seite, was auf Dauer zu einer Störung der Funktionalität und Integrität des artikulären Knorpels führt. Wie aus dem Osteoarthrose-Modell hervorging, äußert sich dies bei den AP-2 ϵ defizienten Mäusen in einer erhöhten Suzeptibilität des Gewebes gegenüber einer Überlastung sowie einer stärkeren Schädigung des Gewebes unter pathophysiologischen Bedingungen.

Insgesamt konnte also zum ersten Mal *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass AP-2 ϵ an der Regulation der Genexpression in Chondrozyten beteiligt ist und die Entstehung und Progression einer Osteoarthrose maßgeblich beeinflusst.

1 Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle des Transkriptionsfaktors AP-2 ϵ (*activating enhancer binding protein 2 epsilon*) in der Knorpel- bzw. Skelettentwicklung sowie Regulatoren der AP-2 ϵ Expression im Verlauf dieser Prozesse. Außerdem wurde der Einfluss von AP-2 ϵ auf die Homöostase und auf pathophysiologische Veränderungen (Osteoarthritis) des adulten Gelenkknorpels analysiert. Die dafür zugrundeliegenden biologischen Abläufe werden in den folgenden Abschnitten anhand der Skelettentwicklung der Wirbeltiere sowie der Pathogenese einer Osteoarthritis im Detail erläutert. Zunächst aber soll der strukturelle Aufbau des hyalinen Gelenkknorpels und des Kniegelenks dargestellt werden.

1.1 Struktureller Aufbau des Kniegelenks und des hyalinen Knorpels



Abb. 1.1: Skelett einer neugeborenen Maus behandelt mit Alcian Blau und Alizarin Rot
Knorpelige Anteile sind blau und verknöcherte Anteile violett gefärbt (Murakami *et al.*, 2004).

Der Begriff Skelett bezeichnet in der Biologie den Teil des Körpers, der die Stützstruktur eines Organismus bildet und ihm Gestalt und Stabilität verleiht. Daneben dient das Skelett als Ansatzstelle der Muskulatur bei Bewegungsabläufen und gewährt Schutz vor mechanischen Einwirkungen (DeLise *et al.*, 2000a). Das Endoskelett der Wirbeltiere (Vertebraten) befindet sich vollständig innerhalb des Körpers (Abb. 1.1) und ist mesodermalen Ursprungs. Während der Wirbeltier-Embryogenese geht es aus pluripotenten Zellen des paraxialen (Präsomiten-Mesoderm) und des lateralen Mesoderms (Seitenplatten-Mesoderm) sowie der Neuralleiste hervor (Staines *et al.*, 2012). Bis auf wenige Ausnahmen (z.B. Knorpelfische) bilden starre, kalzifizierte Knochen die

Hauptkomponenten des Skeletts adulter Wirbeltiere. Diese sind untereinander durch Gelenke verbunden. Funktionell differenziert man zwischen unbeweglichen Synarthrosen (unechte Gelenke, z.B. kraniale Knochennähte) und beweglichen Diarthrosen (echte Gelenke) (Scheibler und Schmidt, 2003).

Im menschlichen Körper stellt das Kniegelenk die größte Diarthrose dar, welche den Oberschenkelknochen (*Femur*) mit dem Schienbein (*Tibia*) verbindet (Abb. 1.2). Distal endet der *Femur* in zwei konvexen Verdickungen, den Kondylen, die auf dem abgeflachten Schienbeinplateau aufsitzen (Blackburn und Craig, 1980). Die hierdurch hervorgerufene, relativ

geringe Kontaktfläche zwischen *Femur* und *Tibia* wird durch die Menisken, zwei halbmondförmige Faserknorpelscheiben, signifikant vergrößert. Die Menisken leisten einen wesentlichen Beitrag zur Integrität und Stabilität des Kniegelenks, indem sie eine Führungmulde für die Kondylen bilden und einen großen Teil der einwirkenden Last weiterleiten (Chivers und Howitt, 2009). Biomechanischen Studien zufolge übertragen die Menisken im Stand ca. 50 % der Axialkräfte im Kniegelenk, während es bei einer starken Beugung bis zu 85 % sind (Cole *et al.*, 2003; Kawamura *et al.*, 2003).

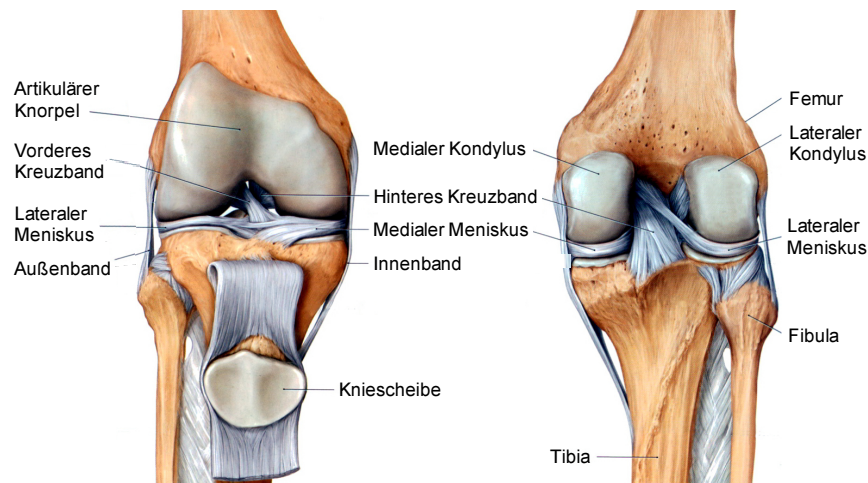


Abb. 1.2: Anatomischer Aufbau des menschlichen Kniegelenks

Links: Ansicht von ventral. Rechts: Ansicht von dorsal (www.corewalking.com, modifiziert).

Der Gelenkknorpel oder auch artikuläre Knorpel ist aus hyalinem Knorpelgewebe aufgebaut und überzieht als dünne Schicht die knöchernen Epiphysen (Knochenenden) an den Kontaktflächen innerhalb eines jeden echten Gelenks. Aufgrund seiner glatten Oberfläche und seines niedrigen Reibungskoeffizienten sorgt er für eine reibungsarme und energiesparende Beweglichkeit der Gelenke. Darüber hinaus wirkt er durch seine hohe Druckelastizität als Stoßdämpfer und reduziert so die Maximalbelastung auf den subchondralen Knochen (Bhosale und Richardson, 2008; Chen *et al.*, 2013). Hyaliner Knorpel ist ein gefäßloses, nicht-innerviertes, zellarmes Stützgewebe, das zum größten Teil aus extrazellulärer Matrix (ECM, engl. *extracellular matrix*) und darin gebundenem Wasser besteht (Abb. 1.3 A) (James und Uhl, 2001). Diese beiden Komponenten sind für die oben genannten biomechanischen Eigenschaften des Gewebes verantwortlich. Die Hauptbestandteile der Knorpel-ECM sind Kollagene, Proteoglykane und Hyaluronan (Hyaluronsäure) (Abb. 1.3 B) (Chen *et al.*, 2006). Kollagenfasern machen bis zu 20 % des Feuchtgewichts des hyalinen Knorpels aus. Dabei handelt es sich primär um fibrilläres Typ 2 Kollagen, welches das Grundgerüst des Gewebes bildet und ihm eine sehr hohe Zugfestigkeit verleiht (Stockwell, 1979; Mayne, 1989).

Verschiedene Proteoglykane aus Protein- und Zuckerbestandteilen sind zwischen den Kollagen-Fasern eingelagert. Das mit Abstand häufigste Proteoglykan im hyalinen Knorpel ist Aggrecan. An ein Aggrecan-Kernprotein sind bis zu 150 lineare, anionische Polysaccharide, sogenannte Glykosaminoglykane (GAG), geheftet (Kiani *et al.*, 2002). Bedingt durch diese Molekülgruppe ist Knorpelgewebe zu einer sehr hohen Aufnahme an Wasser fähig, was dessen Widerstand gegen Kompression begründet (Chen *et al.*, 2006). Die einzelnen Aggrecan-Moleküle liegen dabei nicht isoliert in der Matrix, sondern in Form von großen Proteoglykan-Aggregaten vor (Abb. 1.3 B). Diese sind jeweils aus einem zentralen Hyaluronan-Filament und bis zu 100 Aggrecan-Molekülen, welche je über ein Link-Protein gekoppelt sind, zusammengesetzt (Morgelin *et al.*, 1988; Roughley, 2006). Weitere, nicht aggregierende, Proteoglykane im artikulären Knorpel sind Lubricin, Decorin und Fibromodulin. Letztere steuern die Fibrillogenese von Kollagenen, während Lubricin an den Knorpeloberflächen sowie in der Synovialflüssigkeit (Synovia) vorkommt und als „Gelenkschmiere“ für die Aufrechterhaltung der Gleitfähigkeit des Gelenks verantwortlich ist (Swann *et al.*, 1981; Ameye *et al.*, 2002; Roughley, 2006; Jones *et al.*, 2007).

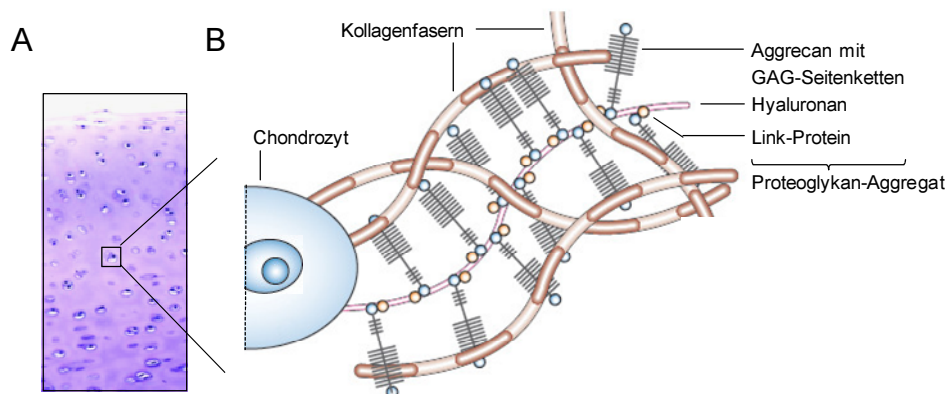


Abb. 1.3: Histologie des hyalinen Knorpels und Zusammensetzung seiner ECM

(A) Mikroskopisches Bild von hyalinem Knorpelgewebe am Beispiel von bovinem Gelenkknorpel nach Toluidinblau-Färbung (Sunk *et al.*, 2006). (B) Schematische Darstellung der wichtigsten ECM-Komponenten von hyalinem Knorpel. Proteoglykan-Aggregate aus Aggrecan mit GAG-Seitenketten, Hyaluronan und Link-Protein sind eingebettet in ein Gerüst aus Kollagen-Fasern (Chen *et al.*, 2006, modifiziert).

Im hyalinen Knorpel existiert nur ein einziger, hochgradig differenzierter und normalerweise nicht proliferierender Zelltyp: Chondrozyten bzw. Knorpelzellen. Diese sind frei im Gewebe verteilt und machen nur 1 bis maximal 10 % des Gesamtvolumens aus (James und Uhl, 2001). Aufgrund der avaskulären Natur des Gewebes erfolgt die Versorgung der Chondrozyten ausschließlich über passive Diffusion. Dadurch bedingt ist der Sauerstoffgehalt im Knorpel relativ niedrig, es herrschen also hypoxische Bedingungen (Bhosale und Richardson, 2008). Diese Faktoren limitieren das Regenerationsvermögen dieses Gewebetyps enorm. Im Vergleich

zu Knochen können Schäden im artikulären Knorpel kaum repariert werden (Chen *et al.*, 2013). Nichtsdestotrotz halten die Chondrozyten im intakten Knorpel ein Gleichgewicht zwischen geringgradiger Matrix-Neusynthese und langsamer Degradation von alten Matrixkomponenten aufrecht (Stockwell, 1979; Chen *et al.*, 2013). Sie alleine sind also für die Homöostase des Gewebes verantwortlich.

Außer in den Gelenken kommt hyaliner Knorpel bei adulten Säugetieren auch in Rippen- und Nasenknorpel und in den Knorpelspangen der Luftröhre vor. Des Weiteren ist er Hauptbestandteil des embryonalen Primordialskeletts der Vertebraten, dessen Morphogenese und anschließende Verknöcherung in den nächsten Abschnitten am Beispiel der Wirbeltier-Extremität im Detail erläutert werden soll.

1.2 Die Skelettentwicklung der Vertebraten

Bei den Wirbeltieren findet die Morphogenese des Großteils ihres knöchernen Endoskeletts über zwei aufeinanderfolgende, hochkomplexe Prozesse statt: Der Chondrogenese (1.2.1) und der sich daran anschließenden enchondralen Ossifikation (1.2.2) (Hinchcliffe und Johnson, 1980; Erlebacher *et al.*, 1995). Während der Chondrogenese, oder auch Knorpelentwicklung, differenzieren kondensierte mesenchymale Zellen zu Chondrozyten, welche um sich herum extrazelluläre Knorpelmatrix aufbauen. Auf diese Weise entstehen sogenannte Skelett- oder Knorpelanlagen, die die Grundstruktur und Lage der später daraus hervorgehenden Knochen festlegen. In der Summe bilden sie ein temporäres Embryonalskelett, das vollständig aus hyalinem Knorpelgewebe besteht. Dieses wächst rasch und wird während der weiteren prä- und postnatalen Entwicklung sukzessive durch Knochengewebe ersetzt (Goldring *et al.*, 2006; Lefebvre und Bhattaram, 2010).

Dabei reifen Knorpelzellen im Zentrum der Knorpelanlage nach mehreren Proliferationsphasen zunächst zu hypertrophen und schließlich zu terminalen Chondrozyten. Dieser Vorgang geht mit einem Umbau der Knorpel-ECM einher, welche mineralisiert und durch Einwachsen von Blutgefäßen vaskularisiert. Über die Kapillaren wandern wiederum mesenchymale Zellen in das Gewebe ein, die zu Osteoblasten und Chondroklasten differenzieren. Durch die katabole Aktivität der Chondroklasten sowie der hypertrophen bzw. terminalen Chondrozyten wird der partielle Abbau der Knorpelmatrix vermittelt. Gleichzeitig sterben die Knorpelzellen ab und werden durch Osteoblasten ersetzt, welche beginnen Knochengrundsubstanz (Osteoid) in die Überreste der Knorpel-ECM einzulagern (Hall, 1988; Horton, 1990; Karsenty und Wagner, 2002). Es kommt so zur Ausbildung des sogenannten primären Ossifikationszentrums. Später

setzt sich dieser Prozess in den embryonalen bzw. postnatalen Wachstumsfugen (1.2.3) sowie in den sekundären Ossifikationszentren der Epiphysen fort (Mackie *et al.*, 2008; Studer *et al.*, 2012). Diese Form der Verknöcherung ausgehend von einer Knorpelvorstufe wird enchondrale Ossifikation genannt (Lefebvre und Bhattaram, 2010). Mit dem Schluss der Wachstumsfugen gegen Ende der Pubertät kommt dieser Prozess schließlich zum Stillstand. Das Endprodukt sind sogenannte Ersatzknochen, zu denen unter anderem alle langen Röhrenknochen der Gliedmaßen zählen (Goldring *et al.*, 2006).

Daneben kommen im Verlauf der Wirbeltierentwicklung noch zwei weitere Formen der Knochenentstehung vor: Bei der perichondralen Ossifikation differenzieren Zellen an den Randbereichen mesenchymaler Kondensationen zunächst zum Perichondrium (Knorpelhaut). Davon ausgehend können sich Osteoblasten absondern, welche die Knorpelstruktur im Inneren mit Knochengewebe umgeben (Horton, 1993; Karsenty, 1999). Bei der desmalen oder auch intramembranösen Ossifikation hingegen differenzieren mesenchymale Zellen direkt zu Osteoblasten, die dann sogenannte Deck- oder Belegknochen bilden. Diese Art der Ossifikation ohne zwischengeschaltete Knorpelvorstufe kommt bei Teilen des Schädels sowie beim Schlüsselbein vor (Hall, 1988; Hall und Miyake, 1992).

1.2.1 Die Chondrogenese

1.2.1.1 Prächondrozytäre, mesenchymale Kondensation

Die Chondrogenese ist der erste wichtige Schritt der Skelettentwicklung. Sie beginnt während der frühen, fötalen Entwicklung mit der Migration undifferenzierter, mesenchymaler Zellen zu den Regionen des Embryos, an denen später die einzelnen Skelettelemente entstehen sollen (Goldring *et al.*, 2006; Studer *et al.*, 2012). An ihren Zielorten durchlaufen sie zunächst einen komplizierten Kondensationsprozess, proliferieren und differenzieren anschließend zu Chondrozyten.

Bei den Extremitäten stellt das laterale Mesoderm den Ursprung dieser uniformen Zellen dar, die in bestimmten Regionen an den Flanken des Embryos, auch Extremitätenfelder genannt, aggregieren und kondensieren (Tickle und Munsterberg, 2001; Saito *et al.*, 2006). Infolge kommt es zur Ausstülpung des darüber liegenden Ektoderms und so zur Bildung der paddelförmigen Extremitätenknospen (engl. *limb buds*), aus denen später die Gliedmaßen hervorgehen. Während des Kondensationsprozesses kommt es initial zu einer starken Zunahme der Zelldichte, was überwiegend auf einer erhöhten Zellaggregation bzw. Zelladhäsion beruht (Searls *et al.*, 1972; Summerbell und Wolpert, 1972; Thorogood und Hinchliffe, 1975). Dies ist

mit einer Zunahme von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, vermittelt durch Zell-adhäsionsmoleküle (1.3.1.2), sowie der Synthese spezifischer Signalmoleküle assoziiert (1.3.1.1) (Goldring *et al.*, 2006). Hierdurch werden Signaltransduktionswege aktiviert, welche die weitere Differenzierung der mesenchymalen Zellen initiieren. Zu diesem Zeitpunkt wird festgelegt, ob die kondensierten Zellen direkt zu Osteoblasten, wie bei der desmalen Ossifikation, oder zu Chondrozyten differenzieren. Man spricht auch von Differenzierung entlang der osteogenen bzw. chondrogenen Richtung, wobei bei den Extremitäten Letztere eingeschlagen wird (Karsenty, 2008; Hartmann, 2009).

1.2.1.2 Chondrogene Differenzierung

Im Zuge der Extremitätenentwicklung differenzieren die mesenchymalen Zellen im Zentrum der Kondensationen zunächst zu Chondroblasten, d.h. teilungsfähigen Vorläuferzellen von Chondrozyten. Dies geht mit einer Veränderung der ECM-Zusammensetzung einher. Während die extrazelluläre Matrix vor der Kondensation größtenteils aus Typ 1 Kollagen, Fibronectin und Hyaluronan zusammengesetzt ist, beginnen die Chondroblasten knorpelspezifisches Typ 2 Kollagen und in geringerem Maße Typ 9 und Typ 11 Kollagen zu produzieren (Kosher *et al.*, 1986; Nah *et al.*, 1988; Kulyk *et al.*, 1991; Swiderski und Solursh, 1992; DeLise *et al.*, 2000a). Ebenso werden große Mengen an Proteoglykanen, insbesondere Aggrecan, und das Protein MIA/CD-RAP (*melanoma inhibitory activity / cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein*) exprimiert und sezerniert (Hascall *et al.*, 1976; Mallein-Gerin *et al.*, 1988; Dietz und Sandell, 1996). Gleichzeitig differenzieren Zellen am äußeren Rand der Kondensation zu Fibroblasten-ähnlichen, perichondralen Zellen, welche das Perichondrium hervorbringen (Karsenty, 1999). Die nun in der Entstehung befindliche Knorpelanlage vergrößert sich durch Proliferation der Chondroblasten und perichondralen Zellen sowie durch eine beträchtliche Synthese von extrazellulärer Matrix. Letztendlich werden die Chondroblasten separiert und vollständig von ECM eingeschlossen, wodurch ihre Zellteilung weitestgehend sistiert (DeLise *et al.*, 2000a; Michigami, 2013). Man spricht dann von Chondrozyten, dem primären Zelltyp der nun ausgereiften, hyalinen Knorpelanlage.

Hiermit ist das Ende der Chondrogenese erreicht. Die Chondrozyten selbst bleiben entweder dauerhaft als Bestandteil des permanenten Gelenkknorpels an den Rändern der Epiphysen erhalten oder sterben im Rahmen der enchondralen Ossifikation und werden durch Osteoblasten ersetzt. Dieser Prozess wird im nächsten Abschnitt erläutert.

1.2.2 Die enchondrale Ossifikation

1.2.2.1 Hypertrophie und Biomineralisation

Die Ausbildung des primären Ossifikationszentrums beginnt im Bereich der Diaphyse (Mittelschaft) der hantelförmigen Knorpelanlage mit der schrittweisen Vergrößerung der nicht mehr proliferierenden Knorpelzellen zu prähypertrophen und schließlich zu hypertrophen Chondrozyten (Hartmann, 2009). Dabei vergrößert sich das Volumen der Zellen um das bis zu 10-fache (Hypertrophie) (Buckwalter *et al.*, 1986; Bush *et al.*, 2008). Dies beruht auf einem Aquaporin-vermittelten Influx von Wasser in die Zelle sowie einer tatsächlichen Zunahme der Zelltrockenmasse durch Steigerung der Organellenzahl (Wang und Zhu, 2011; Cooper *et al.*, 2013). Zusätzlich treten charakteristische Veränderungen im Genexpressionsprofil der Knorpelzellen auf. Während die Expression von verschiedenen Proteoglykanen und Typ 2 Kollagen in den hypertrophen Chondrozyten herunter reguliert wird, wird gleichzeitig die Expression von Typ 10 Kollagen induziert (Schmid und Linsenmayer, 1983; Capasso *et al.*, 1984; Shinomura *et al.*, 1984; Oshima *et al.*, 1989; Nurminskaya und Linsenmayer, 1996). Dieses netzbildende Kollagen wird normalerweise nur von diesem Zelltyp produziert (Castagnola *et al.*, 1986; Linsenmayer *et al.*, 1988; Reichenberger *et al.*, 1991). Außerdem beginnen die hypertrophen Chondrozyten mit der Sezernierung von ALP (*alkaline phosphatase*) und verschiedenen ECM-degradierenden Proteinasen, darunter vorwiegend MMP13 (*matrix metalloproteinase 13*) (Leboy *et al.*, 1989; Wuthier und Register, 1995; Stahle-Backdahl *et al.*, 1997; D'Angelo *et al.*, 2000; Ohkubo *et al.*, 2003). Auf MMP13 soll unter Abschnitt 1.4 noch genauer eingegangen werden.

In Kombination führen diese Enzyme zu einer Umstrukturierung sowie zu einem partiellen Abbau der hyalinen Knorpelmatrix in der Nähe der nun reifen hypertrophen Chondrozyten. Die Sekretion von Hydroxyapatit-enthaltenden Matrix-Vesikeln leitet die Biomineralisation der Knorpelmatrix ein. Hydroxyapatitkristalle bilden die Grundlage der Hartschubstanz aller Wirbeltiere und werden über ALP aus Pyrophosphat und Ca^{2+} -Ionen synthetisiert (Balcerzak *et al.*, 2003). Zuvor abgelagertes Typ 10 Kollagen fungiert dabei als molekulares Gerüst, an welches die Vesikel verankert werden (Shen, 2005). Daran angrenzend differenzieren die Zellen des Perichondriums im Zuge der perichondralen Ossifikation zu Osteoblasten und bilden damit das Periost (Knochenhaut) (Karsenty, 1999). Diese formen eine ringförmige Knochenmanschette um den knorpeligen Kern des zukünftigen Röhrenknochens, die für das prä- und postnatale Dickenwachstum (appositionelles Wachstum) des Knochens verantwortlich ist (Hojo *et al.*, 2010; Wuelling und Vortkamp, 2011).

1.2.2.2 Terminale Differenzierung, Vaskularisation und Ossifikation

Neben ALP und MMP13 beginnen die hypertrophen Chondrozyten auch mit der Sekretion des angiogenetischen Faktors VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Gerber *et al.*, 1999; Zelzer *et al.*, 2004). Man spricht dann auch von terminal differenzierten (hypertrophen) Chondrozyten. Einige Autoren verstehen darunter ein eigenständiges chondrozytäres Differenzierungsstadium, andere hingegen klassifizieren diese Zellen weiterhin als hypertrophe Chondrozyten (Lefebvre und Bhattaram, 2010; Michigami, 2013).

VEGF vermittelt das Einwachsen von feinen Blutgefäßen aus dem Periost in das primäre Ossifikationszentrum (Vaskularisation). Über diese Kapillaren wandern mesenchymale Vorläuferzellen von Osteoblasten und Chondroklasten in die mineralisierte Knorpelmatrix ein (Ducy *et al.*, 1997; Karsenty und Wagner, 2002; Mackie *et al.*, 2008). Während Letztere einen großen Teil der Matrix resorbieren, lagern die Osteoblasten Knochengrundsubstanz in die Überreste der Knorpel-ECM ein. So entsteht primärer Geflechtknochen aus feinen Knochenbälkchen (Trabekel), der die Grundlage für den adulten Lamellenknochen mit dem darin enthaltenen Knochenmark darstellt (Hojo *et al.*, 2010; Wuelling und Vortkamp, 2010). Über das genaue Schicksal der terminalen Chondrozyten wird bis zum heutigen Tage diskutiert (Staines *et al.*, 2013). Der Nachweis aktiver Caspasen, wie z.B. *Cleaved Caspase 3*, in Verbindung mit einer verringerten Expression des endogenen Apoptose-Inhibitors BCL2 (*B-cell lymphoma 2*) deuten stark auf apoptotische Vorgänge hin (Amling *et al.*, 1997; Gibson, 1998; Adams und Shapiro, 2002). Gegen diese Hypothese spricht das Fehlen typischer, Apoptose-assoziiierter Veränderungen der Zellmorphologie, darunter eine Fragmentierung der DNA und die Umstrukturierung des Zytoplasmas und des Zellkerns zu Vesikel-ähnlichen Apoptosekörperchen (Mackie *et al.*, 2008; Staines *et al.*, 2013). Neben Apoptose ist auch ein Zelltod durch Autophagozytose sowie eine Transdifferenzierung von einigen hypertrophen Chondrozyten zu Osteoblasten nicht auszuschließen (Descalzi Cancedda *et al.*, 1995; Roach und Clarke, 2000; Roach *et al.*, 2004; Lefebvre und Bhattaram, 2010).

Ein Gesamtschema über die einzelnen Schritte der Chondrogenese und der enchondralen Ossifikation im primären Ossifikationszentrum ist unter Abbildung 1.4 A dargestellt.

1.2.3 Die Wachstumsfuge

Der in den letzten Abschnitten beschriebene Verknöcherungsprozess im Zentrum der Knorpelanlage setzt sich im Laufe der weiteren Entwicklung beidseitig, axial zu den Epiphysen hin fort. Es kommt so zur Ausbildung von sogenannten embryonalen Wachstumsfugen, die für das

Längenwachstum (interstitielles Wachstum) des entstehenden Röhrenknochens verantwortlich sind. Dieses beruht primär auf der Proliferation der Chondrozyten in den Wachstumsfugen und deren Volumenzunahme im Zuge der hypertrophen Differenzierung (Bush *et al.*, 2008; Wuelling und Vortkamp, 2010). Die Diaphyse wird somit immer länger und die Epiphysen werden simultan nach distal verschoben. Morphologisch betrachtet handelt es sich bei den Wachstumsfugen also um streng definierte Bereiche, in denen sich die enchondrale Ossifikation kontinuierlich und stufenweise wiederholt. Durch die verschiedenen Chondrozyten-subpopulationen werden sie in mehrere, unter dem Lichtmikroskop deutlich voneinander abgrenzbare, Zonen gegliedert (Abb. 1.4 B).

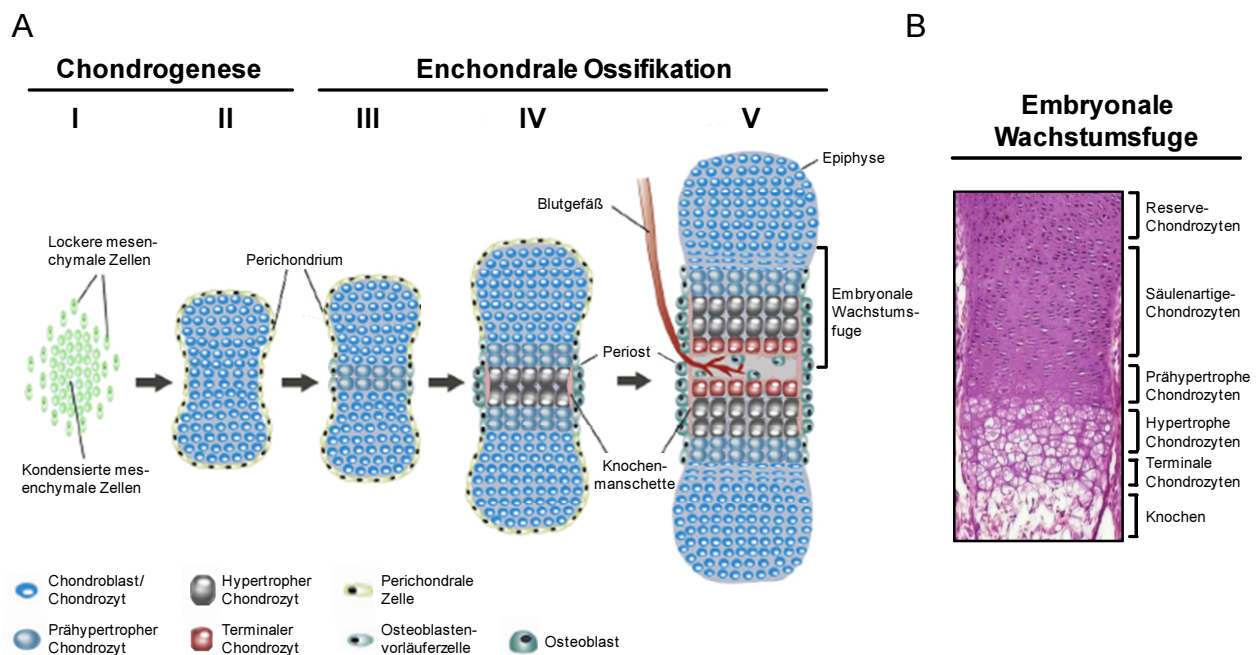


Abb. 1.4: Übersicht über die einzelnen Schritte der Chondrogenese und der enchondralen Ossifikation sowie über die strukturelle Organisation der embryonalen Wachstumsfuge

(A) Die Chondrogenese beginnt mit der Kondensation undifferenzierter mesenchymaler Zellen (I). Anschließend differenzieren diese zu Chondroblasten bzw. Chondrozyten, welche proliferieren und extrazelluläre Matrix produzieren. Auf diese Weise entsteht eine Knorpelanlage, die von perichondralen Zellen (Perichondrium) umhüllt wird (II). Mit Einsetzen der enchondralen Ossifikation differenzieren Chondrozyten im Zentrum der Knorpelanlage zu prähypertrophen Chondrozyten. Daran angrenzend beginnen perichondrale Zellen zu Osteoblasten zu differenzieren (Periost), welche später die Knochenmanschette bilden (III). Die prähypertrophen Zellen im Inneren des primären Ossifikationszentrums blähen sich auf zu hypertrophen Chondrozyten, was mit der lokalen Mineralisation sowie partiellen Degradation der Knorpelmatrix einhergeht (IV). Am Ende der enchondralen Ossifikation induzieren die nun terminal differenzierten Chondrozyten das Einwachsen von Blutgefäßen in die mineralisierte Matrix und sterben schließlich ab. Gleichzeitig wandern über die Kapillaren Osteoblasten ein und beginnen Knochengewebe aufzubauen (V). Dieser Prozess setzt sich sukzessive beidseitig zu den Epiphysen hin fort. Es kommt so zur Ausbildung der embryonalen Wachstumsfugen (Hartmann *et al.*, 2009, modifiziert). (B) Histologisches Bild der embryonalen Wachstumsfuge an einem Längsschnitt durch den Femur eines 16,5 Tage alten Mausembryos nach H/E-Färbung.

Der Prozess der enchondralen Ossifikation dauert auch postnatal weiter an. Einerseits bilden sich kurz nach der Geburt sogenannte sekundäre Ossifikationszentren innerhalb der noch knorpeligen Epiphysen (Wuelling und Vortkamp, 2010). Diese sorgen für die Verknöcherung der Knochenenden, ausgenommen einer dünnen Restschicht aus hyalinem Knorpelgewebe an deren Oberfläche, dem permanenten Gelenkknorpel. Andererseits bleiben die nun beidseitig von Knochengewebe umschlossenen Wachstumsfugen weiterhin erhalten und ermöglichen so auch im Kindes- und Jugendalter das Längenwachstum des Knochens (Hunziker *et al.*, 1987).

Am Ende der Pubertät schließen sich die Wachstumsfugen letztendlich vollständig, wahrscheinlich bedingt durch eine Erschöpfung der chondrozytären Teilungsfähigkeit (Weise *et al.*, 2001; Nilsson *et al.*, 2005; Staines *et al.*, 2013). Das Längenwachstum des Knochens ist an diesem Punkt abgeschlossen.

1.3 Regulatoren der Chondrogenese und der enchondralen Ossifikation

Während der embryonalen und postnatalen Entwicklung ist eine strenge Regulation der Chondrogenese und enchondralen Ossifikation erforderlich, um die einzelnen Schritte zeitlich und räumlich exakt zu koordinieren. Selbst eine geringe Fehlregulation einzelner Schlüssel-moleküle kann zu gravierenden Missbildungen oder zu einem vorzeitigen Schwangerschaftsabbruch führen (Spranger, 2006). Darüber hinaus sind viele der nachfolgenden Regulationsmechanismen nicht nur während der Skelettentwicklung, sondern auch für die Homöostase des adulten Gelenkknorpels entscheidend. Auch hier können Anormalitäten im Genexpressionsprofil der Knorpelzellen die Grundlage von ernsthaften Erkrankungen, wie z.B. einer Osteoarthritis (1.4), sein.

Im Folgenden werden die wichtigsten Regulatoren der Chondrogenese und enchondralen Ossifikation erläutert. Es wird dabei zwischen **extra-** und **intrazellulären** Faktoren unterschieden. Im Fokus stehen physikalische Stimuli und Transkriptionsfaktoren, da diese für den Ergebnisteil dieser Arbeit besonders relevant sind. Nichtsdestotrotz sollen an dieser Stelle auch parakrine bzw. endokrine Signalmoleküle sowie Zelladhäsionsproteine vorgestellt werden, da sie zum Grundverständnis der Skelettentwicklung beitragen. Wo angebracht, wird außerdem kurz die Rolle der Regulatoren im adulten Gelenkknorpel erläutert.

1.3.1 Extrazelluläre Regulatoren

1.3.1.1 Parakrine und endokrine Signalmoleküle

Zu den wichtigsten extrazellulären Regulatoren der Chondrogenese bzw. der enchondralen Ossifikation zählen lokal sekretierte Signalmoleküle. Diese umfassen Mitglieder der FGF (*fibroblast growth factor*), *hedgehog*, Wnt sowie TGF- β (*transforming growth factor beta*) Proteinfamilie. Letztere setzt sich aus TGF- β und BMP (*bone morphogenetic protein*) Liganden zusammen.

Zu Beginn der Chondrogenese wirken viele dieser Faktoren als sogenannte Morphogene oder auch *Patterning* Faktoren, die in bestimmten Regionen der wachsenden Extremitätenknospe sezerniert werden und, ausgehend davon, einen Konzentrationsgradienten im umliegenden Gewebe ausbilden (DeLise *et al.*, 2000a; Tickle, 2003; Goldring *et al.*, 2006). Je nach Dosis und Expositionsdauer führt dies zu unterschiedlich ausgeprägten Reaktionen in den noch undifferenzierten, mesenchymalen Zellen. So werden die exakten Positionen, an denen die Zellen innerhalb der Extremitätenknospe kondensieren und gleichzeitig Anzahl und Grundform der einzelnen Gliedmaßelemente festgelegt. Das am besten charakterisierte Morphogen ist SHH (*sonic hedgehog*), welches für die antero-posteriore Achsenbildung im *Autopodium* sowie die Zahl bzw. Identität der Finger hauptverantwortlich ist (Riddle *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1997; Tickle und Barker, 2013).

Im Anschluss an den Kondensationsprozess ist der Wnt/ β -Catenin Signalweg ein Schlüsselregulator, der die Entwicklungsrichtung der mesenchymalen Zellen beeinflusst. Day und Kollegen konnten zeigen, dass die Aktivierung des Signalwegs die Differenzierung der mesenchymalen Zellen hin zu Osteoblasten und somit die desmale Ossifikation maßgeblich fördert (Day *et al.*, 2005). Den Autoren zufolge ist in den mesenchymalen Zellen eine niedrige Aktivität des Wnt/ β -Catenin Signalwegs nötig, um die Bildung der Knorpelanlagen einzuleiten (Day *et al.*, 2005; Day und Yang, 2008). Ähnlich sind TGF- β 1 bis -3 und BMPs bei der Determination, ob die mesenchymalen Zellen nach ihrer Kondensation zu Chondrozyten oder zu Osteoblasten differenzieren, involviert. Eine Reihe von Studien zeigt klar die pro-chondrogene Wirkung von TGF- β 1, -2 und -3 bei der *in vitro* Differenzierung von mesenchymalen Zellen (Kulyk *et al.*, 1989; Roark und Greer, 1994; Denker *et al.*, 1995; Barry *et al.*, 2001; Tuli *et al.*, 2003; Weiss *et al.*, 2010). BMP-abhängige Signale scheinen hingegen in beide Richtungen wirken zu können, jedoch für die Initiation der Chondrogenese unabdingbar zu sein (Roark und Greer, 1994; Pizette und Niswander, 2000; Yoon und Lyons, 2004).

Später, nach Ausbildung der embryonalen Knorpelanlage, dirigieren IHH (*indian hedgehog*) und PTHrP (*parathyroid hormone-related protein*) das Längenwachstum ebendieser. Zusammen bilden sie innerhalb der embryonalen Wachstumsfuge eine negative *Feedback*-Schleife, die das Maß der Chondrozytenproliferation und den Übergang in die Hypertrophie steuert (Lanske *et al.*, 1996; Vortkamp *et al.*, 1996). PTHrP inhibiert dabei die hypertrophe Differenzierung und hält die Chondrozyten in der Proliferationszone so in einem mitotisch aktiven Zustand (Huang *et al.*, 2001; Stanton *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2006). Umgekehrt wird die Synthese von PTHrP wiederum durch IHH reguliert (Ehlen *et al.*, 2006).

Daneben beeinflussen auch TGF- β -, Wnt- und FGF-Liganden die Differenzierung der Chondrozyten in der embryonalen Wachstumsfuge. Beispielsweise wirken FGF-Rezeptor 3 (FGFR3) vermittelte Signale inhibitorisch auf das Längenwachstum, indem sie die Chondrozytenproliferation negativ und die hypertrophe Differenzierung positiv beeinflussen (Colvin *et al.*, 1996; Minina *et al.*, 2002; Lefebvre und Bhattaram, 2010). Dementsprechend sind dauerhaft-aktive FGFR3-Mutanten die Grundlage für die häufigsten Formen von Minderwuchs beim Menschen (Ornitz, 2005; Horton und Degen, 2009). Weiterhin werden alle drei TGF- β Subtypen in hypertrophen Chondrozyten exprimiert und wirken dort der hypertrophen Differenzierung entgegen (Ballock *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 2001; Hojo *et al.*, 2010). Im Gegenteil scheint der Wnt/ β -Catenin Signalweg die hypertrophe Differenzierung der Zellen zu fördern (Tamamura *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2009). Bei Mausembryonen mit einem konditionalen Verlust von β -Catenin in Chondrozyten ist die enchondrale Ossifikation dementsprechend verzögert (Akiyama *et al.*, 2004).

Im Gegensatz zu diesen parakrinen Signalmolekülen sind endokrine Faktoren (Hormone) vorwiegend für das postnatale Längenwachstum der Röhrenknochen entscheidend, indem sie die Proliferations- und Differenzierungsrate der Chondrozyten in den postnatalen Wachstumsfugen direkt oder indirekt modulieren. Beispielsweise fördern GH (*growth hormone*) und TH (*thyroid hormone*) das Längenwachstum der Knochen (Hunziker *et al.*, 1987; Shao *et al.*, 2006). Estrogene wiederum sind bei beiden Geschlechtern am Schluss der Wachstumsfugen beteiligt, indem sie den Übergang der proliferierenden Chondrozyten in die Seneszenz beschleunigen (Weise *et al.*, 2001; Nilsson *et al.*, 2005).

1.3.1.2 Zelladhäsionsmoleküle

Neben Signalmolekülen haben auch membranständige Adhäsionsmoleküle und deren Liganden bei der Regulation der Chondrogenese und der enchondralen Ossifikation wichtige Funktionen, da sie eine Verbindung zwischen den mesenchymalen bzw. chondrozytären Zellen und ihrer unmittelbaren Umgebung herstellen.

Für die Ausbildung von Zell-Matrix-Interaktionen sind in erster Linie Integrine entscheidend. Dabei handelt es sich um transmembrane Glykoprotein-Heterodimere, die nahezu in allen tierischen Zellen vorkommen und sich jeweils aus einer von 19 alpha und einer von 8 beta Untereinheiten zusammensetzen (Humphries, 2000; Hynes, 2002). Die Hauptaufgabe dieser Oberflächenrezeptoren ist die Verankerung der Zellen an der extrazellulären Matrix, indem sie das Aktin-Zytoskelett mit verschiedenen Komponenten der ECM verbinden (Takada *et al.*, 1997; Giancotti und Ruoslahti, 1999). Daneben sind sie an der Übertragung von extrazellulären Signalen aus der Knorpelmatrix in den Zellkern beteiligt (Amano *et al.*, 1997; Studer *et al.*, 2012). Integrine werden praktisch in allen Stadien der Chondrogenese und enchondralen Ossifikation exprimiert und sind an einer Vielzahl von regulatorischen Abläufen beteiligt (Hirsch *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 2008). Während der Chondrogenese hat das Integrin beta 1 die wichtigste Funktion, da es in Kombination mit bestimmten alpha Untereinheiten an Kollagene ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ bzw. $\alpha 10\beta 1$) sowie an Fibronektin ($\alpha 5\beta 1$) bindet (Enomoto *et al.*, 1993; Loeser, 2002). Darüber hinaus ist die Molekülgruppe wichtig für die Homöostase und die Integrität von adultem Knorpelgewebe (Guilak, 2011; Jang *et al.*, 2013).

Da Chondrozyten im Knorpelgewebe durch Matrix-Proteine getrennt sind und somit nur einzeln oder in sehr kleinen Zellverbänden vorliegen, spielen direkte Zell-Zell-Kontakte bei der Regulation der Chondrogenese eine eher untergeordnete Rolle. Allerdings sind sie beim initialen Kondensationsprozess für die Zusammenlagerung der mesenchymalen Zellen essentiell. Die wichtigsten Adhäsionsmoleküle hierbei sind die Glykoproteine N-CAM (*neural cell adhesion molecule*), das zur Familie der Immunglobuline zählt, sowie N-Cadherin (*neural cadherin*) (DeLise *et al.*, 2000a). Mit Einsetzen der Kondensation kommt es in den mesenchymalen Zellen zu einem transienten Anstieg der N-CAM und N-Cadherin Expression, welche im weiteren Verlauf der Chondrogenese aber wieder vollständig verloren geht (Tuli *et al.*, 2003; Lefebvre und Bhattaram, 2010). Der Einfluss beider Moleküle auf den frühen Kondensationsprozess konnte *in vitro* bestätigt werden. So führte die Zugabe von inhibitorischen Antikörpern jeweils zu einer Reduktion der Aggregation, während die Überexpression von N-CAM in einer gesteigerten Zellaggregation resultierte (Chuong *et al.*, 1993; Widelitz *et al.*, 1993; Oberlender und Tuan, 1994).

1.3.1.3 Physikalische Stimuli

Außer den, in den letzten beiden Abschnitten beschriebenen, körpereigenen extrazellulären Regulatoren beeinflussen auch physikalische Stimuli die Chondrogenese und die enchondrale Ossifikation. Unter anderem tragen extrinsische, mechanische Einwirkungen sowohl zur Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen als auch von Chondrozyten im wachsenden Embryo bei (Kelly und Jacobs, 2010; Responde *et al.*, 2012). Kompression führt zu zahlreichen Veränderungen im Inneren von Zellverbänden, wie z.B. Strömung von interstitieller Gewebsflüssigkeit oder Deformation von Mechanorezeptoren an der Oberfläche der Zellen. Letztere setzen sich aus mechano-sensitiven Ionenkanälen sowie Integrinen zusammen (Millward-Sadler und Salter, 2004; Ramage *et al.*, 2009; O'Connor *et al.*, 2013). Auch das primäre, nicht-motile Zilium, das als sensorische Antenne an nahezu allen Zellen vorkommt, wird als deformierbarer mechano-sensitiver Zellfortsatz diskutiert (O'Connor *et al.*, 2013).

Angele und Kollegen konnten zeigen, dass eine periodische, hydrostatische Belastung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC, engl. *human mesenchymal stem cells*) *in vitro* einen positiven Effekt auf die chondrogene Differenzierung sowie auf die ECM-Synthese hat (Angele *et al.*, 2003; Angele *et al.*, 2004). Vergleichbare Ergebnisse wurden mit isolierten mesenchymalen Zellen aus murinen Extremitätenknospen generiert, bei denen nach Belastung eine signifikante Steigerung der Typ 2 Kollagen und Aggrecan Expression detektierbar war (Takahashi *et al.*, 1998). Dass mechanische Stimuli, hervorgerufen durch Bewegungen des Embryos, für die regelrechte Skelettentwicklung in den Wirbeltierextremitäten tatsächlich notwendig sind, wurde durch Immobilisierung von Maus- bzw. Hühnerembryonen *in vivo* nachgewiesen. Diese Tiere wiesen anormal ausgebildete primäre Ossifikationszentren verbunden mit verkürzten Oberschenkel- bzw. Unterschenkelknochen sowie Fehler in der Gelenkkavitation auf (Lamb *et al.*, 2003; Nowlan *et al.*, 2010; Roddy *et al.*, 2011). Darüber hinaus ist eine physiologische Belastung auch für die Erhaltung des adulten Gelenkknorpels wichtig. Der Konsens ist, dass sowohl eine chronische Überbelastung als auch Unterbelastung schädlich für den artikulären Knorpel ist und das Entstehen von Gelenkerkrankungen begünstigen kann (Goldring und Goldring, 2007; Guilak, 2011; Sulzbacher, 2013).

Aufgrund seiner avaskulären Natur ist die Sauerstoffkonzentration im Inneren des hyalinen Knorpels mit zunehmender Mächtigkeit deutlich geringer als in Gewebe mit Blutgefäßen. Man spricht auch von Sauerstoffmangel bzw. Hypoxie. Verschiedene Studien belegen, dass auch dieser physikalische Stimulus bei der Chondrogenese und der Extremitätenentwicklung eine entscheidende Rolle spielt. Der primäre Mediator zellulärer Adaptationsprozesse an

Veränderungen in der Sauerstoffversorgung ist der Transkriptionsfaktorkomplex HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*) (Wang *et al.*, 1995; Kallio *et al.*, 1997). HIF-1 ist als Heterodimer aktiv und besteht aus den Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β . Während HIF-1 β stabil in der Zelle vorliegt, wird HIF-1 α unter physiologischer Sauerstoffkonzentration (Normoxie) kontinuierlich durch O₂- und Fe₂-abhängige Prolylhydroxylasen (PHD) hydroxyliert, im Anschluss durch die Von Hippel-Lindau E3 Ubiquitin-Ligase (pVHL) ubiquitiniert und schließlich im Proteasom degradiert (Halbwertszeit ca. 5 min) (Kallio *et al.*, 1999; Masson und Ratcliffe, 2003). Umgekehrt sind die Prolylhydroxylasen unter Sauerstoffmangel inaktiv, woraufhin es zur Stabilisierung und Akkumulation von HIF-1 α im Zytoplasma kommt. In der Folge transloziert der Faktor in den Zellkern und bildet dort zusammen mit der β -Untereinheit den transkriptionell aktiven HIF-1 Komplex. Dieser erkennt und bindet sogenannte HRE Motive (engl. *hypoxia responsive element*) mit der Konsensussequenz 5'-RCGTG-3' in Promotor- oder Enhancerbereichen von Zielgenen und aktiviert so deren Expression (Ke und Costa, 2006).

In vivo und *in vitro* Experimente offenbarten, dass bereits in den frühen mesenchymalen Zellkondensation der Extremitätenknospen hypoxische Bedingungen herrschen, und dass HIF-1 α die frühe Differenzierung dieser Zellen hin zu Chondrozyten fördert (Robins *et al.*, 2005; Amarilio *et al.*, 2007; Provot *et al.*, 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass HIF-1 α auch später in den bereits etablierten Knorpelanlagen aktiv ist und für die normale Ausbildung der Wachstumsfugen bzw. Gelenke essentiell ist (Schipani, 2005; Provot *et al.*, 2007). Mäuse mit einer Knorpelzell-spezifischen Deletion von *HIF-1 α* wiesen eine massive Chondrozyten-Apoptoserate auf und starben kurz nach der Geburt (Schipani *et al.*, 2001).

Im Gegensatz zur embryonalen Skelettentwicklung ist die Rolle von Hypoxie im adulten Gelenkknorpel nach wie vor kontrovers. Sauerstoffmangel scheint einerseits chondro-protectiv zu wirken, indem HIF-1 α als sogenannter *Survival*-Faktor Gene für anaerobe Stoffwechselprozesse und ECM-Bestandteile aktiviert (Pfander *et al.*, 2003; Murphy und Polak, 2004; Yudoh *et al.*, 2005; Lafont, 2010; Thoms *et al.*, 2013). Umgekehrt konnte für den Transkriptionsfaktor HIF-2 α , welcher eng mit HIF-1 α verwandt ist, eine fördernde Wirkung auf die Pathogenese einer Osteoarthritis nachgewiesen werden (Jimenez *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2010). Saito und Kollegen propagieren, dass HIF-2 α , im Gegensatz zu HIF-1 α , in Chondrozyten nicht primär post-translational durch Hypoxie, sondern vielmehr durch andere Transkriptionsfaktoren auf transkriptioneller Ebene reguliert wird. Dies würde auch das nicht deckungsgleiche Aktivitätsmuster von HIF-1 und HIF-2 im Verlauf der Chondrogenese erklären (Saito *et al.*, 2010).

1.3.2 Intrazelluläre Regulatoren - Transkriptionsfaktoren

Im Regelfall aktivieren die in den vorherigen Abschnitten beschriebenen extrazellulären Regulatoren nachgeschaltete Signalwege im Inneren der Zelle. Letztendlich führt dies zur Expression oder Aktivitätssteigerung von intrazellulären Regulatoren, d.h. primär Chondrozyten-spezifische Transkriptionsfaktoren, welche ihrerseits die Transkriptionsrate anderer Gene positiv oder negativ beeinflussen. Auf diese Weise steuern sie die Differenzierung, Proliferation und Syntheseleistung der Knorpelzellen. Im Folgenden seien nun diejenigen Transkriptionsfaktoren dargestellt, die speziell für die Chondrozytendifferenzierung charakteristisch sind. Ferner kann das Genexpressionsprofil von Knorpelzellen auch durch epigenetische Mechanismen wie DNA-Methylierung oder posttranskriptionell, z.B. durch MicroRNAs, moduliert werden (Furumatsu und Ozaki, 2010; Barter *et al.*, 2012). Hierauf soll im Rahmen dieser Arbeit aber nicht separat eingegangen werden.

1.3.2.1 SOX9, L-SOX5 und SOX6

Der Transkriptionsfaktor SOX9 [*SRY (sex determining region Y) box 9*] wurde als einer der wichtigsten transkriptionellen Regulatoren im Verlauf der Knorpelentwicklung identifiziert. SOX9 ist ein Mitglied der SOX-Genfamilie, welche eng mit dem auf dem Y-Chromosom kodierten, geschlechtsbestimmenden Faktor SRY (*sex determining region of chromosome Y*) verwandt ist.

Expressionsanalysen an mesenchymalen Zellen aus den Extremitätenknospen von Maus-embryonen konnten belegen, dass Sox9 bereits vor deren Kondensation exprimiert wird (Wright *et al.*, 1995). Der konditionale *knockout* von Sox9 in den Zellen verhinderte den Kondensationsprozess vollständig und folglich blieb die Morphogenese der Knorpelanlagen aus (Akiyama *et al.*, 2002). Weitere Studien von Bi und Kollegen bekräftigten, dass der Transkriptionsfaktor für die Initiation der Chondrogenese sowie des mesenchymalen Kondensationsprozesses essentiell ist (Bi *et al.*, 1999).

SOX9 wird im weiteren Verlauf der Chondrogenese bis hin zum prähypertrophen Differenzierungsstadium konstitutiv exprimiert, charakteristischerweise ist er in hypertrophen Chondrozyten jedoch nicht mehr nachweisbar (Wright *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1997). Dies lässt vermuten, dass der Transkriptionsfaktor der hypertrophen Differenzierung entgegenwirkt. Der Hypothese entsprechend, konnte in den Wachstumsfugen von heterozygoten Sox9 *knockout* Embryonen ein vorzeitiger Eintritt der proliferierenden Chondrozyten in die Hypertrophie und eine verfrühte Mineralisation der Matrix beobachtet werden (Bi *et al.*, 2001). Die Tiere sterben

kurz nach der Geburt und zeigen starke Fehlbildungen bzw. Verbiegungen von all denjenigen Knochen, die über die enchondrale Ossifikation aus Knorpelvorstufen hervorgehen (Bi *et al.*, 2001). Ein ähnliches Bild zeigt sich bei CD(Campomele Dysplasie)-Patienten, einer Skelettdysplasie, der eine heterozygote Mutation im *SOX9*-Gen zu Grunde liegt (Hovmoller *et al.*, 1977; Foster, 1996).

Wichtige Zielgene von SOX9 in mesenchymalen und chondrozytären Zellen sind die Gene für die Matrix-Proteine Typ 2 Kollagen, Aggrecan sowie MIA/CD-RAP (Zhou *et al.*, 1995; Lefebvre *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 1999; Sekiya *et al.*, 2000). Bei Mausembryonen, in denen die Sox9 Expression nach Ablauf der mesenchymalen Kondensation ausgeschaltet wurde, kam es zu einer stark verminderten Synthese dieser Genprodukte. Gleichzeitig stoppten die mesenchymalen Zellen mit der Proliferation und differenzierten nicht weiter zu Chondroblasten bzw. Chondrozyten (Akiyama *et al.*, 2002).

Neben SOX9 sind noch zwei weitere Mitglieder der SOX-Transkriptionsfaktorfamilie an der Skelettentwicklung beteiligt: L-SOX5 (*long*) und SOX6. Während Mäuse, bei denen entweder *L-Sox5* oder *Sox6* deletiert wurde, kaum einen chondrozytären Phänotyp zeigen, unterbleibt nach einem simultanen *knockout* beider Gene die Ausbildung von Knorpelgewebe nahezu vollständig (Smits *et al.*, 2001). Es konnte nachgewiesen werden, dass SOX9 selbst die Expression der anderen beiden SOX-Proteine aktiviert, sie also *downstream* von SOX9 liegen (Ikeda *et al.*, 2004). Zusammen bilden sie einen Transkriptionsfaktorkomplex, welcher die Expression der weiter oben beschriebenen SOX9-Zielgene induziert (Lefebvre *et al.*, 1998; Lefebvre *et al.*, 2001). SOX9 ist somit derjenige Transkriptionsfaktor, welcher die chondrogene Differenzierung der mesenchymalen Zellen einleitet, indem er die Expression von Chondrozyten-spezifischen Genen aktiviert und gleichzeitig die Expression von Osteoblasten-spezifischen Genen inhibiert. In Verbindung mit L-SOX5 und SOX6 hält er die Chondrozyten im weiteren Verlauf der Chondrogenese in einem proliferativen Zustand und hemmt deren hypertrophe Differenzierung. Diese Effekte werden mitunter durch SOX9-vermittelte Inhibition des Transkriptionsfaktors RUNX2 auf transkriptioneller und Protein-Ebene erwirkt.

1.3.2.2 RUNX2

Während SOX9 vor allem die frühe Differenzierung der mesenchymalen Zellen und Chondroblasten reguliert, ist RUNX2 (*runt-related transcription factor 2*) oder auch CBFA-1 (*core binding factor alpha 1*), für den Übergang in die Hypertrophie und die Induktion der enchondralen Ossifikation essentiell. In Runx2 defizienten Mäusen kommt es nicht zu einer Verknöcherung des knorpeligen Primordialskeletts. Das heißt, das komplette Skelett besteht bis

zur Geburt und dem gleichzeitigen Tod der Tiere komplett aus Knorpel, da die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten nicht stattfindet (Kim *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 2001). Umgekehrt resultierte die Überexpression von Runx2 im Mesenchym von Hühnerembryonen in einer erhöhten Zahl an hypertrophen Chondrozyten (Eames *et al.*, 2004).

Die Expression von RUNX2 ist in proliferierenden Chondroblasten und Chondrozyten kaum nachweisbar, steigt aber in prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten stark an (Kim *et al.*, 1999; Enomoto *et al.*, 2000). Dort steuert der Transkriptionsfaktor den vollständigen Ablauf der hypertrophen Differenzierung bis in das terminale Stadium und induziert die Expression der Hypertrophie-assoziierten Gene *MMP13*, *COL10A1* (*collagen, type X, alpha 1*) und *VEGF* (Jimenez *et al.*, 1999; Enomoto *et al.*, 2000; Zelzer *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2011).

Außer in hypertrophen Chondrozyten ist die Expression von RUNX2 aber auch bereits in undifferenzierten mesenchymalen Zellen nach ihrer Kondensation, jedoch noch vor der Determination, in welche Richtung die Zellen differenzieren, detektierbar. RUNX2 steuert hier die Differenzierung der Zellen hin zu Osteoblasten und leitet somit die desmale Ossifikation ein (Ducy *et al.*, 1997; Komori *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2006; Hartmann, 2009). Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass die Expression von RUNX2 in den kondensierten mesenchymalen Zellen herunter reguliert werden muss, um die chondrogene Differenzierung einzuleiten. Hierfür ist SOX9 hauptverantwortlich, dessen Expression nach der mesenchymalen Kondensation durch extrazelluläre Signale (z.B. über TGF- β und bestimmte BMPs) hochgehalten wird.

Es ließ sich zeigen, dass SOX9 direkt mit RUNX2 interagiert und dessen Aktivität auf diese Weise minimiert (Zhou *et al.*, 2006). Gleichzeitig induziert SOX9 die Expression des transkriptionellen Repressors NKX3-2 (*NK3 homeobox 2*), welcher die Expression des *RUNX2*-Gens inhibiert (Lengner *et al.*, 2005; Yamashita *et al.*, 2009). Das heißt SOX9 wirkt doppelt dominant-negativ über RUNX2 und fördert so die chondrogene Differenzierung. Gleichzeitig verhindert SOX9 über diesen Mechanismus eine vorzeitige Reifung der proliferierenden Chondrozyten zu hypertrophen Zellen. Geht die Expression von SOX9 in den proliferierenden Chondrozyten aufgrund von rückläufigen TGF- β - und PTHrP-abhängigen Signalen bzw. verstärktem Wnt/ β -Catenin-Signaling zurück, lässt diese doppelt-inhibitorische Wirkung nach und RUNX2 induziert die hypertrophe Differenzierung der Knorpelzellen (Tamamura *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2009).

1.3.2.3 AP-2 Familie und AP-2 ϵ

Mitglieder der AP-2 (*activating enhancer binding protein 2*) Transkriptionsfaktor-Familie sind ebenfalls an der Knorpel- bzw. Skelettentwicklung beteiligt. Bis heute wurden beim Menschen und bei der Maus fünf verschiedene AP-2 Isoformen kloniert und charakterisiert: AP-2 alpha, -beta, -gamma, -delta und -epsilon (Mitchell *et al.*, 1987; Williams *et al.*, 1988; Moser *et al.*, 1995; Williamson *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2001; Feng und Williams, 2003; Wang *et al.*, 2004). Die zugehörigen humanen bzw. murinen Gene tragen die Bezeichnungen *TFAP2A* bis *-E* bzw. *Tfap2a* bis *-e* (*transcription factor AP-2*).

Die Faktoren sind jeweils als Homo- bzw. Heterodimere regulatorisch aktiv (Williams und Tjian, 1991). Analysen der Proteinsequenz haben gezeigt, dass allen Isoformen am C-Terminus ein charakteristisches, hochkonserviertes Helix-span-Helix Motiv aus durchschnittlich 130 Aminosäuren gemein ist (Abb. 1.5) (Eckert *et al.*, 2005; Wenke und Bosserhoff, 2010). Dieses scheint, ähnlich wie das Helix-loop-Helix bzw. Helix-turn-Helix Motiv, aus 2 voneinander getrennten α -Helices zu bestehen und ist für die Dimerisierung zweier AP-2 Proteine verantwortlich (Williams und Tjian, 1991). Gleichzeitig vermittelt es zusammen mit der davorliegenden basischen Domäne die Bindung des AP-2 Dimers an die Ziel-DNA (Williams und Tjian, 1991). Bei dieser Domäne handelt es sich um einen ebenfalls stark konservierten Abschnitt aus ca. 20 Aminosäuren, welcher einen hohen Anteil an Arginin und Lysin beinhaltet (Eckert *et al.*, 2005; Wenke und Bosserhoff, 2010). Beide Aminosäuren tragen unter neutralem pH-Wert eine positive Nettoladung, was die Interaktion mit der negativ geladenen DNA unterstützt. Am N-terminalen Ende der AP-2 Aminosäurekette befindet sich die weniger stark konservierte Transaktivierungsdomäne aus ca. 90 Aminosäuren (Abb. 1.5). Mit Ausnahme von AP-2 δ ist allen AP-2 Isoformen in dieser Region ein charakteristisches PY-Motiv (YFPPPY) zu eigen (Eckert *et al.*, 2005). Zusammen mit wenigen weiteren konservierten Aminosäuren innerhalb der Transaktivierungsdomäne ist dieses Motiv für die regulatorische Funktion der AP-2 Dimere essentiell (Williams und Tjian, 1991; Wankhade *et al.*, 2000). Ähnliche Prolin-reiche Sequenzmotive sind auch bei vielen anderen Transkriptionsfaktoren Bestandteil der Transaktivierungsdomäne. Von mehreren ist bekannt, dass das PY-Motiv die Interaktion der Faktoren mit einzelnen Komponenten des Transkriptions-Präinitiationskomplexes vermittelt (Mermoud *et al.*, 1989; Gerster *et al.*, 1990; Kim und Roeder, 1994). Der genaue Mechanismus über den AP-2 Transkriptionsfaktoren die Modulation der Genexpressionsrate erwirken, und ob dafür weitere Kofaktoren wichtig sind, ist noch nicht eindeutig geklärt. Zweifellos lässt das Fehlen des PY-Motivs bei AP-2 δ auf einen alternativen Modus der Transaktivierung schließen.

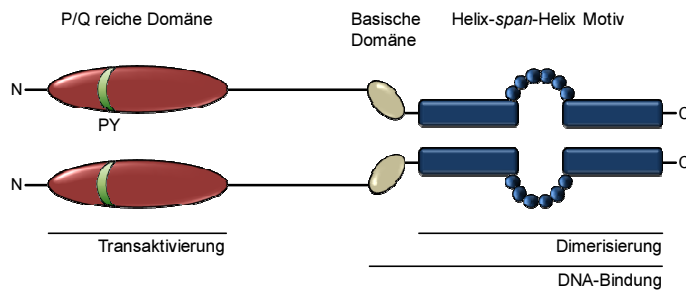


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Proteinstruktur eines AP-2 Dimers

Die P/Q-reiche Domäne am N-Terminus (rot) mit einem internen PY-Motiv (grün) ist für die Modulation der Genexpression (Transaktivierung) verantwortlich. Das Helix-span-Helix Motiv am C-Terminus dient der Dimerisierung zweier AP-2 Proteine und vermittelt zusammen mit der basischen Domäne die Bindung an die Ziel-DNA (Eckert *et al.*, 2005, modifiziert).

Genauer analysiert ist hingegen das DNA-Sequenzmotiv über das AP-2 Faktoren ihre Zielgene erkennen. Williams und Kollegen identifizierten das Palindrom 5'-GCCN₃GGC-3' als klassische AP-2 Konsensusbindestelle, die in einer Reihe von viralen und zellulären Promotoren vorkommt (Williams und Tjian, 1991; Hilger-Eversheim *et al.*, 2000). Über einen *in vitro* Ansatz konnte außerdem eine Interaktion mit den folgenden Varianten des Motivs festgestellt werden: 5'-GCCN₄GGC-3' und 5'-GCCN_{3/4}GGG-3' (Mohibullah *et al.*, 1999).

AP-2 Transkriptionsfaktoren haben wichtige regulatorische Funktionen bei Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen von zahlreichen Geweben und Organen. Im Allgemeinen wirken sie der Differenzierung und Apoptose von Zellen entgegen bzw. fördern die Zellproliferation (Eckert *et al.*, 2005). Dabei können die Moleküle, je nach zellulärem Kontext und Kofaktorbindung, sowohl als Aktivatoren als auch Repressoren der Genexpression fungieren (Hilger-Eversheim *et al.*, 2000). Dies geht insbesondere aus Studien von AP-2 α , dem am besten charakterisierten AP-2 Transkriptionsfaktor, hervor, bei denen eine Reihe von positiv bzw. negativ regulierten Zielgenen identifiziert werden konnte (vgl. Hilger-Eversheim *et al.*, 2000).

Trotz ihres ähnlichen strukturellen Aufbaus und des teilweise überlappenden Expressionsmusters haben die einzelnen AP-2 Isoformen *in vivo* individuelle, nicht-redundante Funktionen. Dies wird insbesondere durch die jeweiligen *Tfap2 knockout* Mausmodelle ersichtlich. Während AP-2 α , - β und - γ defiziente Tiere aufgrund unterschiedlichster Missbildungen bereits während der frühen Embryonalentwicklung oder kurz nach der Geburt sterben, sind AP-2 ϵ und - δ defiziente Mäuse lebensfähig und erscheinen phänotypisch normal (Hilger-Eversheim *et al.*, 2000; Eckert *et al.*, 2005; Wenke und Bosserhoff, 2010). Dennoch ist nicht auszuschließen, dass eine Isoform den Verlust einer anderen bei der Entwicklung bestimmter Gewebetypen kompensieren kann, dies aber in den *knockout* Tieren maskiert ist (Wenke und Bosserhoff, 2010).

Erste Hinweise auf den Einfluss von AP-2 Transkriptionsfaktoren auf die Skelettentwicklung zeigten sich bei AP-2 α defizienten Mäusen. Neben schweren neuronalen Defekten weisen diese

Tiere starke Missbildungen an den Knochen des Schädels, des Rumpfes und der Extremitäten auf (Schorle *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996). Darüber hinaus kommt es bei chimären Mäusen bestehend aus *knockout* und WT Zellen zu Verdopplungen von verschiedenen Knochen in den Extremitäten, was auf eine morphogene Rolle von AP-2 α hindeutet (Nottoli *et al.*, 1998). Die Expression von AP-2 α wurde während der murinen Entwicklung in der Neuralleiste, dem peripheren Nervensystem, dem Mesenchym des Schädels und den Extremitätenknospen nachgewiesen (Moser *et al.*, 1997a). Außerdem wurde AP-2 α bei adulten Mäusen in Chondrozyten der Wachstumsfuge sowie des Gelenkknorpels und der Menisken über immunhistochemische Analysen detektiert (Davies *et al.*, 2002). *In vitro* ging die Expression von AP-2 α im Verlauf der Differenzierung der chondrogenen Vorläuferzelllinie ATDC5 mit Insulin bzw. TGF- β kontinuierlich zurück (Huang *et al.*, 2004). Die artifizielle Überexpression von AP-2 α in diesen Zellen hatte zudem eine deutliche Abnahme der Proteoglycan-Produktion sowie der mRNA-Expression von Typ 2 bzw. Typ 10 Kollagen, Aggrecan und L-SOX5 bzw. SOX6 zur Folge (Huang *et al.*, 2004). Funktionell scheint AP-2 α also einen inhibitorischen Einfluss auf die Chondrozytendifferenzierung zu haben und die Zellen in einem prä-chondrozytären Zustand zu halten (Goldring *et al.*, 2006).

Auch AP-2 β und AP-2 γ werden zu bestimmten Stadien der Mausembryogenese in den Extremitätenknospen exprimiert, während die Expression von AP-2 δ auf das Gehirn, das Herz und die Netzhaut beschränkt ist (Chazaud *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2001; Rock *et al.*, 2007). AP-2 β defiziente Mäuse haben einen Finger-ähnlichen Anhang am fünften Finger der Vorder- und zum Teil auch der Hinterpfoten, möglicherweise verursacht durch eine veränderte Bmp2 bzw. Bmp4 Expressionsrate in den embryonalen Extremitätenknospen (Zhao *et al.*, 2011). Ansonsten weisen diese Tiere aber keine Abnormalitäten in der Skelettentwicklung auf und sterben aufgrund einer polyzystischen Nierendeformation kurz nach der Geburt (Moser *et al.*, 1997b). Ob AP-2 γ *in vivo* für die Extremitätenentwicklung wichtig ist, kann derzeit nicht beurteilt werden, da die entsprechenden *knockout* Embryonen bereits an Embryonaltag 7 bis 9 abgehen (Werling und Schorle, 2002).

AP-2 ϵ wurde während der murinen Entwicklung erstmalig ab Embryonaltag 9,5 in bestimmten Arealen des Mes- (Mittel-) und Rhombencephalon (Hinter- und Nachhirn) sowie dem Bulbus olfactorius (Hauptriechkolben) identifiziert (Feng und Williams, 2003; Wang *et al.*, 2004). In Letzterem persistiert die Expression bis an Tag 7 *post partum* und ist ab Tag 14 überhaupt nicht mehr im murinen Zentralnervensystem detektierbar (Feng und Williams, 2003; Wang *et al.*, 2004). Wie bereits erwähnt haben adulte *Tfap2e knockout* Mäuse keinen offensichtlich anormalen Phänotyp, allerdings konnten Feng und Kollegen deutliche Anomalien in der

Architektur des *Bulbus olfactorius* feststellen, was das Riechvermögen der Tiere aber widererwarten nicht zu beeinträchtigen scheint (Feng *et al.*, 2009). Des Weiteren konnte AP-2ε in der Haut von adulten Mäusen mittels *Northern Blot* Analyse nachgewiesen werden (Tummala *et al.*, 2003). Zudem wird AP-2ε auch in der Haut des Menschen sowie in humanen Keratinozyten exprimiert, wo der Faktor *in vitro* an Promotorabschnitte von *KRT1* und *KRT14* (*Keratin*) bindet (Tummala *et al.*, 2003). Die genaue Funktion des Transkriptionsfaktors in diesem Gewebetyp wurde bisher aber nicht untersucht.

Darüber hinaus wurde die Expression von AP-2ε von Wenke und Kollegen unlängst in der Chondrosarkomzelllinie SW1353 sowie in humanen, artikulären Chondrozyten auf mRNA- bzw. Protein-Ebene nachgewiesen (Wenke *et al.*, 2006). Gleichzeitig konnte mit *ITGA10*, welches das Transmembranprotein Integrin α10 kodiert, ein erstes potentiell Zielgen von AP-2ε in Knorpelzellen ermittelt werden (Wenke *et al.*, 2006). In einer nachfolgenden Promotorstudie zeigte sich *in vitro* und *in vivo* eine direkte Interaktion zwischen SOX9 und dem Promotor von *TFAP2E*, was eine signifikante Aktivierung des Promotors herbeiführte (Wenke *et al.*, 2009). Die Regulation der AP-2ε Expression durch SOX9 konnte auf mRNA Ebene bestätigt werden (Wenke *et al.*, 2009). Außerdem wurde festgestellt, dass die Expression des Transkriptionsfaktors bei der Behandlung von hMSC mit TGF-β erst relativ spät im Verlauf der chondrozytären Differenzierung deutlich ansteigt. Wie aus der Analyse des Differenzierungsmarkers Typ 10 Kollagen hervorging, korrelierte diese späte Phase der hMSC Differenzierung mit dem hypertrophen Entwicklungsstadium von Knorpelzellen (Wenke *et al.*, 2009). Die Lokalisation von AP-2ε in hypertrophen Chondrozyten konnte schließlich mittels Immunhistochemie an Gewebeschnitten von Mausembryonen bestätigt werden, wobei Vergleichsgewebe aus *Tfap2e knockout* Mäusen als Negativ-Kontrolle fungierte (Wenke *et al.*, 2009). Die Tatsache, dass Sox9 in diesem Knorpeldifferenzierungsstadium normalerweise kaum exprimiert wird, macht das Vorhandensein weiterer, noch unbekannter Regulationsmechanismen der AP-2ε Expression wahrscheinlich.

Letztendlich wurde, im Vergleich zu Chondrozyten aus gesunden Menschen, eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors in Chondrozyten aus Osteoarthritis-Patienten festgestellt (Wenke *et al.*, 2009). Diese Vordaten gaben erste Hinweise auf eine potentielle Rolle des Transkriptionsfaktors AP-2ε im Verlauf der Chondrogenese bzw. bei der Homöostase des adulten Gelenkknorpels und der Pathogenese einer Osteoarthritis. Bevor im Ergebnisteil dieser Arbeit die molekulare Funktion von AP-2ε sowie Regulationsmechanismen der AP-2ε Expression in Chondrozyten näher charakterisiert werden, soll zunächst noch auf die Entstehung und den Verlauf einer Osteoarthritis eingegangen werden. Abschließend sei an

dieser Stelle ein schematischer Überblick über die hier vorgestellten intra- und extrazellulären Regulatoren der Chondrogenese und der enchondralen Ossifikation sowie deren Wirkungsweisen im Verlauf der Chondrozytendifferenzierung gezeigt (Abb. 1.6).

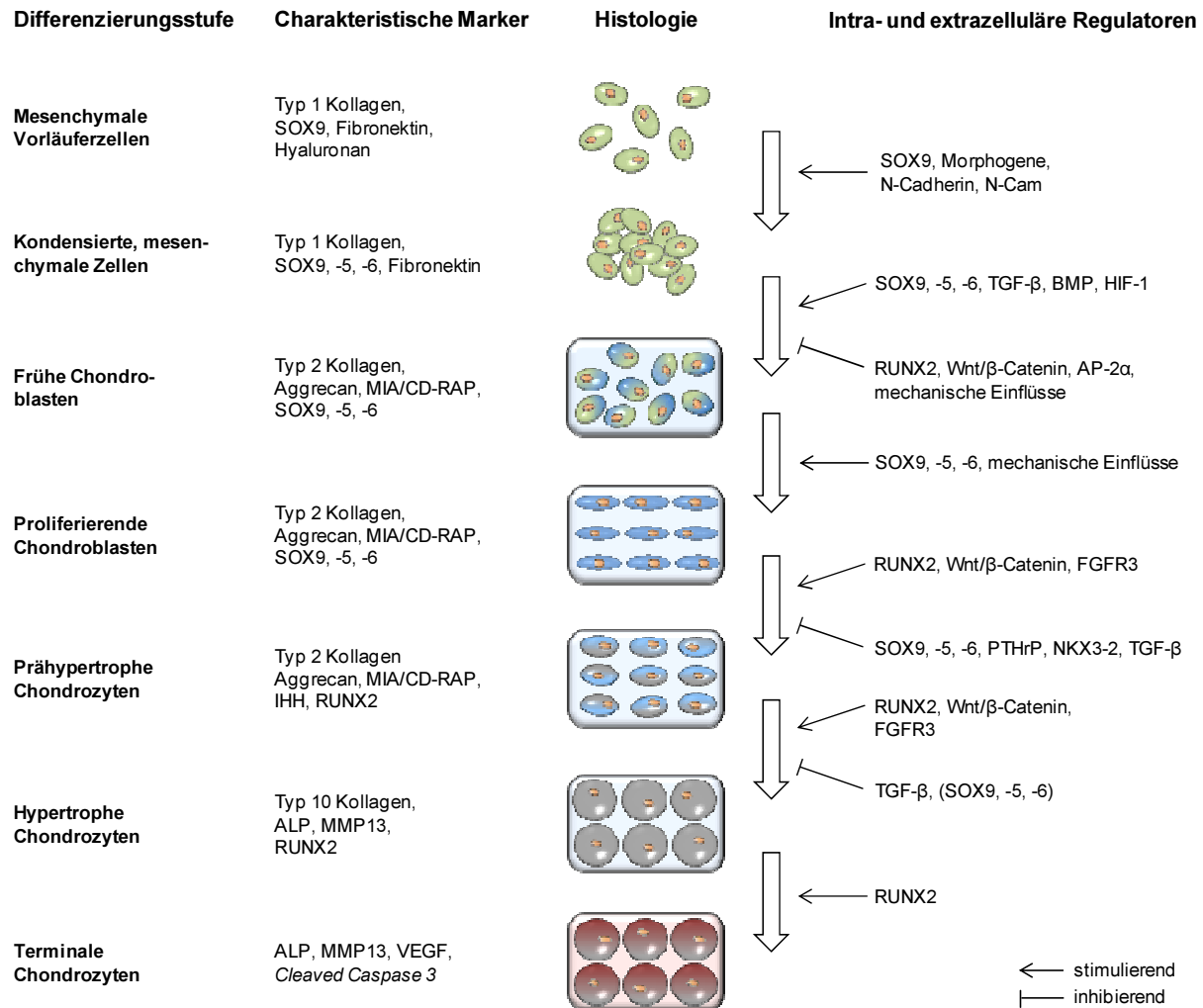


Abb. 1.6: Schematische Übersicht über die Regulatoren der Chondrozytendifferenzierung

Dargestellt sind die Chondrozyten-Differenzierungsstufe, charakteristische Marker der jeweiligen Stufe, das histologische Erscheinungsbild sowie die in dieser Arbeit beschrieben, regulatorischen Mechanismen und Moleküle, welche den Übergang von einer Differenzierungsstufe in die Nächste beeinflussen.

1.4 Pathogenese einer Osteoarthritis

Die Osteoarthritis (OA) oder auch *Arthrosis deformans* ist die mit Abstand häufigste Form der Arthropathie (Gelenkerkrankung) (Sulzbacher, 2013). In westlichen Nationen weisen bis zu 50 Prozent der über 65-Jährigen Anzeichen bzw. Symptome einer OA auf (Lawrence *et al.*, 2008; Murphy *et al.*, 2008). Dabei handelt es sich primär um eine chronische, nicht-entzündliche Erkrankung des artikulären Knorpels. Sie ist vorwiegend durch den progressiven Abbau von

Knorpelsubstanz, ausgelöst durch biochemische und metabolische Veränderungen in den Chondrozyten, gekennzeichnet. Der vorherrschenden Hypothese nach verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen Matrix-Neusynthese und Degradation, das im intakten Gelenkknorpel für die Homöostase und Funktion des Gewebes essentiell ist, im Verlauf der Krankheit zunehmend auf die katabole Seite (Appleton *et al.*, 2007; Goldring und Goldring, 2007; Guilak, 2011; Pulsatelli *et al.*, 2013). Auf lange Sicht kommt es so zu einer umfassenden Degradation des hyalinen Knorpelüberzugs, verbunden mit starken Schmerzen und einem nahezu vollständigen Funktionsverlust des betroffenen Gelenks (Felson, 2006). Prinzipiell kann eine OA bei allen Gelenken auftreten, meist aber sind Knie, Hüfte und Hände betroffen (Pulsatelli *et al.*, 2013). Die genauen molekularen Ursachen ihrer Entstehung sind bis heute unklar. Der Hauptrisikofaktor ist ein voranschreitendes Lebensalter, häufig einhergehend mit Modifikationen in der Zusammensetzung und der strukturellen Organisation von ECM-Komponenten, verbunden mit einer Veränderung des Wassergehalts und einer erhöhten Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies im Gewebe (Goldring und Goldring, 2007; Loeser, 2010). Daneben müssen aber auch noch andere Kriterien wie anormale Belastung, hervorgerufen durch Übergewicht oder degenerative Gelenkveränderungen (z.B. Schäden am Meniskus oder Riss des vorderen Kreuzbandes), Geschlecht, genetische Prädisposition oder Traumata involviert sein, da nicht jeder ältere Mensch zwangsweise eine OA entwickelt (Carrington, 2005). Trotz des multifaktoriellen Entstehungsprozesses und der heterogenen Natur der Osteoarthritis gibt es histologische und molekularbiologische Gemeinsamkeiten, die sehr häufig zu beobachten sind. Nach einem Modell von van der Kraan und van den Berg, 2012 lässt sich die Erkrankung grob in vier Stadien einteilen, wobei mehrere Stadien auch gleichzeitig in einem Gelenk auftreten können:

Während dem subklinischen **Initiationsstadium** kommt es zunächst zu einer Induktion der normalerweise geringen Stoffwechselrate einiger artikulärer Chondrozyten, insbesondere an Stellen mit hoher Belastung oder einer traumatischen Vorschädigung des Knorpelgewebes (Loeser, 2010). Die Zellen werden aktiviert und sezernieren verstärkt ECM-Bestandteile wie Aggrecan und Typ 2 Kollagen (Aigner *et al.*, 1992; Matyas *et al.*, 1995; Hermansson *et al.*, 2004). Außerdem bilden sich Zell-Cluster aus proliferierenden Chondrozyten, die häufig auch noch später an den Randbereichen der geschädigten Knorpelareale zu beobachten sind (van der Kraan und van den Berg, 2012; Sulzbacher, 2013). Beides wird allgemein als Reparaturversuch gedeutet, der die weitere Progression der Krankheit verzögern, aber letztendlich nicht aufhalten kann (Loeser, 2010). Teilweise akquiriert eine Subpopulation von Chondrozyten darüber hinaus einen Hypertrophie-ähnlichen Phänotyp, möglicherweise aufgrund Rekapitulation embryonaler

Differenzierungsprozesse, die im Zuge der enchondralen Ossifikation (1.2.2) auftreten (Pitsillides und Beier, 2011; Loeser *et al.*, 2012). Diese Zellen verlieren ihre normale Synthesefunktion und induzieren die Expression von Proteinen, die für hypertrophe Chondrozyten charakteristisch sind, unter anderem Typ 10 Kollagen und ALP (von der Mark *et al.*, 1992; Boos *et al.*, 1999; Pfander *et al.*, 2001; Dreier, 2010).

Beim Übergang in das **Progressionsstadium** kommt es bei den anormalen Chondrozyten lokal zur erhöhten Produktion und Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen (z.B. Interleukin-1 β oder Tumornekrosefaktor), welche auto- und parakrin die katabole Aktivität der Zellen erhöhen (Tardif *et al.*, 1999; Tetlow *et al.*, 2001; Loeser *et al.*, 2012). In der Folge werden von den Knorpelzellen verstärkt Matrix-degradierende Enzyme sezerniert, welche als katabole Mediatoren für den Abbau von Proteoglykanen und Kollagenen verantwortlich sind. Eine bedeutende Rolle spielen dabei Mitglieder der MMP-Familie, die unter anderem als Kollagenasen und Aggrecanasen fungieren. MMP13 bzw. Kollagenase 3 wurde dabei als das zentrale Typ 2 Kollagen degradierende Enzym charakterisiert, das in fast allen Fällen von Osteoarthritis überexprimiert wird, während dies bei anderen MMP-Varianten wie MMP1, 3 und 8 nicht immer der Fall ist (Billinghurst *et al.*, 1997; Shlopov *et al.*, 1997; Cawston und Wilson, 2006). Wie alle Matrix-Metalloproteinasen ist MMP13 eine Zink- und Calcium-abhängige Endopeptidase und bildet zusammen mit MMP1 und MMP8 die MMP-Subfamilie der Kollagenasen. MMP13 weist dabei die höchste Affinität und Umsatzrate bezüglich der α -Ketten der Typ 2 Kollagen Tripelhelix auf (Mitchell *et al.*, 1996; Shlopov *et al.*, 1997; Krane und Inada, 2008). Neben Kollagen spaltet MMP13 aber auch Proteoglykane, wie z.B. Aggrecan (Singer *et al.*, 1995; Fosang *et al.*, 1996; Mercuri *et al.*, 2000).

Durch die hieraus resultierende lokale Veränderung der biomechanischen Umgebung sowie Erzeugung von Matrixabbauprodukten werden weitere benachbarte Knorpelzellen über Aktivierung membranständiger Rezeptoren (z.B. Integrine) in einem sich selbstverstärkenden Prozess zur Synthese von ECM-degradierenden Proteasen angeregt (Pulai *et al.*, 2005; Echtermeyer *et al.*, 2009; Goldring, 2012). Zusätzlich binden und aktivieren native Typ 2 Kollagen Fibrillen, die im gesunden Knorpel durch Proteoglykane maskiert sind, den DDR-2 Rezeptor (*discoidin domain receptor-2*), wodurch die Expression von MMP13 zusätzlich gesteigert wird (Xu *et al.*, 2005). Darüber hinaus bewirken freiwerdende Matrixfragmente die Infiltration von Immunzellen in den Gelenksspalt (Goldring und Goldring, 2007; Lee *et al.*, 2013). Es kommt mit dem Voranschreiten der Osteoarthritis somit sekundär eine entzündliche Komponente hinzu, die im Regelfall aber von geringerem Ausmaß als bei Patienten Rheumatoider Arthritis ist (Pozgan *et al.*, 2010). Nichtsdestotrotz scheint die so hervorgerufene

Synovialitis stark mit der klinischen Manifestation der Erkrankung in Form von Schmerzen zu korrelieren (Torres *et al.*, 2006; Hill *et al.*, 2007).

Im **Spätstadium** der OA werden die Schäden am artikulären Knorpel schließlich histologisch deutlich sichtbar. Zunächst lassen sich an der artikulären Knorpeloberfläche Läsionen und Fissuren (*superficial fibrillation*) erkennen, die sich später in die Tiefe des Gewebes ausweiten (*deep fibrillation*) (Pritzker *et al.*, 2006). Außerdem gibt es Bereiche mit inhomogenem Färbeverhalten nach der Behandlung mit Hämatoxylin und Eosin, was auf einen Schwund des endogenen Proteoglykangehalts in der Knorpelmatrix hinweist.

Wird das **Endstadium** erreicht, ist der hyaline Knorpelüberzug schließlich großflächig erodiert und der subchondrale Knochen, mit darin enthaltenen freien Nervenendigungen als Quelle starker Schmerzen, tritt an die Oberfläche (Goldring und Goldring, 2007). Außerdem findet man an den Randbereichen der Gelenke häufig Osteophyten, abgegrenzte kalzifizierte Strukturen, die aus mesenchymalen Stammzellen des Periosts hervorgehen, sowie Anzeichen synovialer Fibrose (Pritzker *et al.*, 2006; van der Kraan und van den Berg, 2012). Dieses Bild zeigt sich typischerweise, wenn ein chirurgischer Eingriff am Gelenk (Arthroplastik) zur Wiederherstellung der Funktionalität erforderlich wird (van der Kraan und van den Berg, 2012). Neben den hier genannten Mediatoren werden in der Literatur zahlreiche weitere Moleküle, Transkriptionsfaktoren und Signalwege beschrieben, die die Progression einer Osteoarthritis beeinflussen können. Dazu zählen unter anderem die Wnt/ β -Catenin- und *hedgehog*-Signalwege, HIF-2 α und Mitglieder der TGF- β Familie (vgl. Pulsatelli *et al.*, 2013 und Lee *et al.*, 2013). Aufgrund der großen Zahl und Heterogenität der involvierten Regulatoren gestaltet sich eine effektive Therapie einer OA schwierig. Bis zum heutigen Tage sind die Therapieoptionen limitiert auf Entlastung des Gelenks und die Behandlung der Symptome sowie verschiedene operative Eingriffe im Endstadium der Erkrankung, deren Ziel es ist die defekte Knorpelmatrix teilweise wiederherzustellen oder zu ersetzen (Alcaraz *et al.*, 2010). Dazu zählen Mikrofrakturierung des subchondralen Knochens, die auf einer Auswanderung und Differenzierung von Knochenmarkstammzellen zu Chondrozyten beruht, sowie die autologe bzw. allogene Transplantation von Knorpelfragmenten (engl. *grafts*) (Bhosale und Richardson, 2008; Bijlsma *et al.*, 2011). Bisher haben diese Methoden jedoch allesamt nur einen relativ geringen Erfolg. Als letzte Option bleibt der Einsatz eines künstlichen Gelenks. Aus diesem Grund ist die Entwicklung von pharmakologischen Therapeutika, welche die Progression der Erkrankung signifikant verlangsamen oder sogar aufhalten könnten, eines der wichtigsten Ziele der Osteoarthritis-Forschung.

1.5 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit sollte zum molekularen Verständnis der Chondrozytendifferenzierung, der Homöostase von adultem Knorpelgewebe sowie der Pathogenese einer Osteoarthritis beitragen. Im Fokus lag dabei der Einfluss des Transkriptionsfaktors AP-2 ϵ auf die Expression von Genen, die für diese Prozesse relevant sind. Das Protein konnte sowohl während der Chondrogenese als auch im artikulären Knorpel detektiert werden. Darüber hinaus wurde eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors in OA-Chondrozyten festgestellt. Ungeachtet dessen, blieb die Rolle von AP-2 ϵ im Knorpel noch weitgehend ungeklärt. Für diese Arbeit ließen sich diesbezüglich folgende drei Teilziele ableiten:

1. Im ersten Abschnitt dieser Arbeit sollten grundsätzliche regulatorische Funktionen von AP-2 ϵ in Knorpelzellen aufgedeckt werden. Dies wurde über die Ermittlung von Chondrozyten-spezifischen Genen, welche durch den Transkriptionsfaktor reguliert werden, adressiert. Im Vorfeld zu dieser Arbeit konnte über einen *ChIP-on-Chip*-Ansatz bereits eine Reihe potentieller AP-2 ϵ Zielgene ausfindig gemacht werden. Dabei kristallisierte sich *CXCL1* als vielversprechendster Kandidat heraus, weshalb *CXCL1* über eine entsprechende Promotorstudie als AP-2 ϵ Zielgen verifiziert werden sollte. Außerdem wurde eine Regulation von *COL2A1* durch AP-2 ϵ festgestellt, was ebenfalls genauer betrachtet wurde.
2. Obgleich AP-2 ϵ im murinen Knorpelgewebe exprimiert wird, erscheinen adulte AP-2 ϵ defiziente Mäuse normal. Nichtsdestotrotz, wäre es möglich, dass bei den Tieren im Verlauf der embryonalen Skelettentwicklung transiente Abnormalitäten auftauchen, die Rückschlüsse bezüglich der Rolle des Transkriptionsfaktors bei der Chondrogenese bzw. der enchondralen Ossifikation zulassen würden. Aus diesem Grund wurde im zweiten Teil dieser Arbeit die Skelettentwicklung von *Tfap2e* $-/-$ und WT Embryonen in verschiedenen Stadien verglichen. Davon abgesehen wurde im Rahmen dieser Analyse Hypoxie als möglicher Induktor der AP-2 ϵ Expression untersucht.
3. Schließlich wurde im letzten Abschnitt der Einfluss des Transkriptionsfaktors bei der Pathogenese einer Osteoarthritis analysiert. Dazu wurden adulte WT und *Tfap2e* $-/-$ Mäuse einem OA-Modell unterzogen und die Progression der Erkrankung verglichen. In diesem Rahmen wurde die Bedeutung von AP-2 ϵ auf die Homöostase des artikulären Knorpelgewebes konkretisiert.

2 Ergebnisse

2.1 Identifikation neuer Zielgene von AP-2 ϵ in humanen Chondrozyten

Zur Ermittlung von Genen, welche in Chondrozyten möglicherweise durch den Transkriptionsfaktor AP-2 ϵ reguliert werden, wurde von Frau Dr. A.K. Wenke (Abteilung für molekulare Pathologie am Universitätsklinikum Regensburg) im Vorfeld zu dieser Arbeit eine Chromatin-Immunpräzipitation durchgeführt. Dabei kam ein spezifischer α -AP-2 ϵ Antikörper und Chromatin aus OA-Chondrozyten, in denen AP-2 ϵ verstärkt exprimiert wird (Wenke *et al.*, 2009), zum Einsatz. Hierdurch wurden genomische DNA-Bereiche, an die AP-2 ϵ *in vivo* bindet, präzipitiert und diese anschließend auf einen GeneChip® Human Promoter 1.0R Array (Affymetrix, Santa Clara, USA) hybridisiert. So konnte eine Reihe von Genen identifiziert werden, mit deren Promotorsequenzen AP-2 ϵ potentiell interagiert. Nach weiterer Literaturrecherche kristallisierte sich das Gen *CXCL1* [*chemokine (C-X-C motif) ligand 1*] als vielversprechender Kandidat heraus.

Von *CXCL1*, welches das Chemokin CXCL1 oder auch GRO α (*growth-regulated protein α*) kodiert, ist bekannt, dass es in OA-Chondrozyten im Vergleich zu Chondrozyten aus gesundem Knorpel verstärkt exprimiert wird (Borzi *et al.*, 1999). Dies konnte bereits von Fr. Dr. Wenke über eine quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) Analyse bestätigt und somit in Korrelation zur erhöhten AP-2 ϵ Expression in OA-Chondrozyten gesetzt werden (Wenke *et al.*, 2011). Außerdem ließ sich eine signifikante Zunahme der CXCL1 mRNA-Konzentration nach Transfektion von primären Chondrozyten mit einem Expressionskonstrukt für AP-2 ϵ feststellen (Wenke *et al.*, 2011). Dies waren bereits deutliche Hinweise, dass *CXCL1* ein Zielgen von AP-2 ϵ in Chondrozyten darstellt, was im Folgenden über eine entsprechende Promotorstudie bestätigt werden sollte.

2.1.1 Positive Regulation von *CXCL1* durch AP-2 ϵ

Um *CXCL1* als AP-2 ϵ Zielgen zu verifizieren und vor allem eine direkte Interaktion von AP-2 ϵ mit dem *CXCL1* Promotor nachzuweisen, wurde zunächst ein 1500 bp umfassender, genomischer DNA-Abschnitt (-1500 bis -1 bp relativ zum Translationsstart) im 5'-Bereich des humanen *CXCL1* Gens mittels der MatInspector Software auf potentielle AP-2 Bindestellen (5'-GCCN_{3/4}GGC/G-3') hin untersucht. Innerhalb der Sequenz konnten drei AP-2 Motive lokalisiert werden: -1398 bis -1390 bp (AP-2.1), -144 bis -135 bp (AP-2.2) und -67 bis -59 bp (AP-2.3). Dies ist in Abbildung 2.1 skizziert.



Abb. 2.1: Schematische Darstellung des *CXCL1* Promotors (-1500 bis -1 bp)

Die drei über eine *in silico* Analyse identifizierte AP-2 Bindemotive sind rot markiert: AP-2.1 (-1398 bis -1390 bp), AP-2.2 (-144 bis -135 bp) und AP-2.3 (-67 bis -59 bp). Der Transkriptionsstart ist mit einem Pfeil gekennzeichnet, der 5'-untranslatierte Bereich ist gelb und der Translationsstart (ATG) blau hinterlegt. Alle Zahlenangaben (in bp) beziehen sich auf den Translationsstart. Die Nukleotide zwischen -1213 und -299 bp sind nicht dargestellt.

Hierauf basierend, wurde ein entsprechendes *CXCL1* Promotorfragment von -1448 bis -17 bp erstellt, und in das promotorlose Luziferase Reporterplasmid pGL3-Basic kloniert (p*CXCL1*prom1448) (4.5.1.4). Nach transienter Transfektion des Konstrukts in die humane Chondrosarkomzelllinie SW1353 (4.4), verwendet als Modellsystem für Chondrozyten, wurde dessen Aktivität in Reporter Assays bestimmt (Abb. 2.2). Im Vergleich zu pGL3-Basic wies p*CXCL1*prom1448 eine stark erhöhte Grundaktivität auf (ca. 210-fach), welche durch Ko-transfektion eines Expressionsplasmids für AP-2 ϵ noch signifikant weiter zunahm (ca. 2,6-fach).

Um einzugrenzen, welche der vorhergesagten AP-2 Bindestellen für die Aktivierung des *CXCL1* Promotors durch AP-2 ϵ entscheidend ist bzw. sind, wurden zwei zusätzliche Deletionskonstrukte generiert und in Reporter Assays analysiert: p*CXCL1*prom299 (-299 bis -17 bp) mit AP-2.2 und AP-2.3, sowie p*CXCL1*prom128 (-128 bis -17 bp), welches nur das Motiv AP-2.3 beinhaltet (4.5.1.4).

Im Vergleich zu p*CXCL1*prom1448 zeigte p*CXCL1*prom128 eine deutlich niedrigere Grundaktivität, wohingegen sie bei p*CXCL1*prom299 in etwa auf gleichem Level lag (Abb. 2.2). Entscheidender war, dass die Expression des *Luziferase* Reportergens im Fall von p*CXCL1*prom128, im Gegensatz zu p*CXCL1*prom299, nicht länger durch gleichzeitige Überexpression von AP-2 ϵ induziert werden konnte (Abb. 2.2).

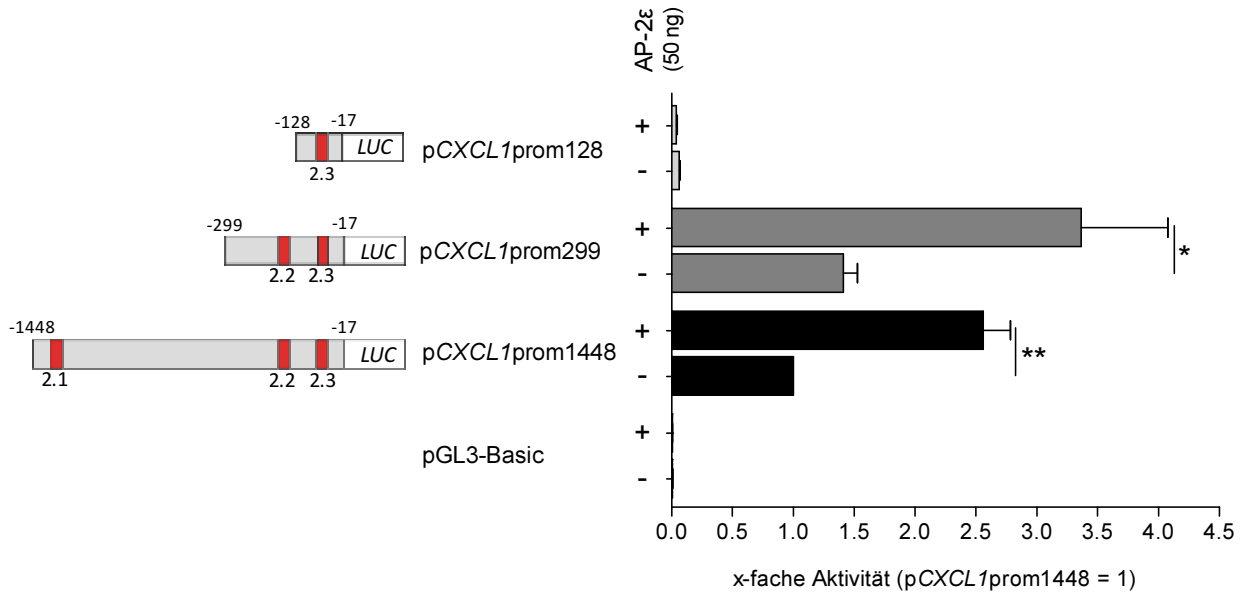


Abb. 2.2: Regulation des *CXCL1* Promotors durch AP-2ε

Die Grundaktivität der verschiedenen *CXCL1* Promotorkonstrukte wurde in der Zelllinie SW1353 bestimmt. Zusätzlich wurde der Einfluss von AP-2ε auf die Promotoraktivität durch Kotransfektion eines entsprechenden Expressionsplasmids analysiert. Links sind die einzelnen *CXCL1* Promotorfragmente schematisch dargestellt. Die putativen AP-2 Bindestellen sind rot markiert. Im Vergleich zum Kontrollvektor pGL3-Basic zeigten pCXCL1prom1448 und pCXCL1prom299 eine sehr hohe Grundaktivität, welche sich außerdem durch AP-2ε signifikant steigern ließ. Demgegenüber war die Aktivität von pCXCL1prom128 relativ gering und nahm nach Überexpression von AP-2ε nicht zu. (Luziferase Assay)

Diese Ergebnisse legten nahe, dass pCXCL1prom128 keine AP-2ε Bindestelle besitzt und gleichzeitig, dass das Bindemotiv AP-2.2 für die Regulation des *CXCL1* Promotors durch AP-2ε hauptverantwortlich ist.

Um Letzteres zu beweisen, wurden im Konstrukt pCXCL1prom299 innerhalb der palindromischen Nukleotidsequenz von AP-2.2 zwei Basen so mutiert, dass eine Interaktion des Transkriptionsfaktors AP-2ε mit der Plasmid-DNA nicht mehr möglich war (pCXCL1prom299_AP-2.2*) (4.5.1.4). Aufgrund dieser Veränderung kam es, verglichen mit dem unmutierten Plasmid, zu einer signifikanten Reduktion der Grundaktivität des Reportergenkonstrukts um ca. 45 % (Abb. 2.3 A). Darüber hinaus resultierte die Kotransfektion eines AP-2ε Expressionsplasmids bei pCXCL1prom299_AP-2.2* nicht länger in einer Zunahme der Chemilumineszenzintensität in den Reportergen Assays.

Um dies auch im Kontext des größeren Promotorfragments in Verbindung mit AP-2.1 zu zeigen, wurden in pCXCL1prom1448 die Bindemotive AP-2.2 und AP-2.1 gleichzeitig oder unabhängig voneinander mutiert (4.5.1.4). Verglichen mit dem WT Konstrukt hatte die Mutation von AP-2.1 (pCXCL1prom1448_AP-2.1*) weder einen Effekt auf die Grundaktivität des Promotors noch auf dessen Aktivierung durch AP-2ε (Abb. 2.3 B). Im Gegensatz dazu

konnten sowohl nach alleiniger Mutation von AP-2.2 (pCXCL1prom1448_AP-2.2*), als auch bei gleichzeitiger Mutation von AP-2.1 und AP-2.2 (pCXCL1prom1448_AP-2.1/2.2*) vergleichbare Effekte, wie zuvor bei pCXCL1prom299_AP-2.2*, beobachtet werden: Die Grundaktivität des Promotorkonstrukts nahm signifikant ab und konnte durch Kotransfektion eines Expressionsplasmids für AP-2 ϵ nicht mehr gesteigert werden (Abb. 2.3 B).

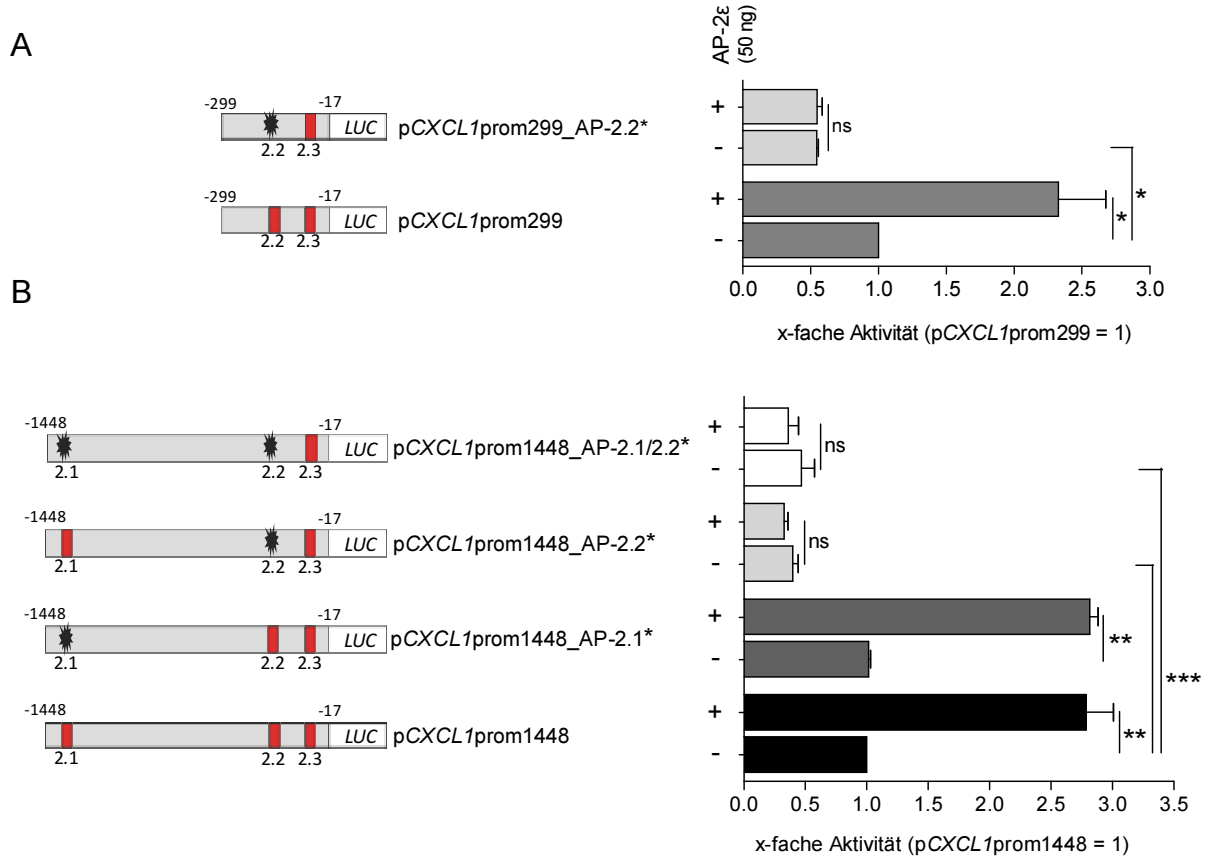


Abb. 2.3: Mutation putativer AP-2 Bindestellen im CXCL1 Promotor

Die putativen AP-2 Bindestellen AP-2.1 bzw. AP-2.2 wurden in pCXCL1prom299 und pCXCL1prom1448 über Nukleotidaustausch verändert und die Aktivität der mutierten Konstrukte in SW1353 analysiert. Mutierte AP-2 Bindemotive sind in den Promotorfragmenten (links) durch einen schwarzen Stern symbolisiert. **(A)** Mutation des Bindemotivs AP-2.2 in pCXCL1prom299 resultierte in einer signifikanten Abnahme der Grundaktivität um etwa 45 %. Zusätzlich konnte die Aktivität des Promotorkonstrukts nicht mehr durch Kotransfektion eines Expressionsplasmids für AP-2 ϵ gesteigert werden. **(B)** Vergleichbare Effekte wie bei pCXCL1prom299_AP-2.2* konnten nach Mutation von AP-2.2 in pCXCL1prom1448 beobachtet werden. Demgegenüber hatte die alleinige bzw. gleichzeitige Mutation von AP-2.1 keine (weiteren) Auswirkungen auf die Aktivität des Promotorkonstrukts. (A/B: Luziferase Assay)

Um völlig auszuschließen, dass AP-2.1 an der Regulation des CXCL1 Promotors durch AP-2 ϵ beteiligt ist, wurde das Bindemotiv unabhängig vom Promotorbereich um AP-2.2 analysiert. Hierzu wurde ein 235 bp Fragment (-1448 bis -1213 bp) in einen pGL3-Promoter Vektor mit einer internen SV40 Promotorsequenz kloniert (pCXCL1enh) und wiederum dessen Aktivität, mit und ohne Überexpression von AP-2 ϵ , in der Zelllinie SW1353 bestimmt. Wie in Abbildung

2.4 dargestellt, wurde weder der Kontrollvektor noch pCXCL1enh in Bezug auf ihre Reprotergenexpression durch AP-2 ϵ beeinflusst.

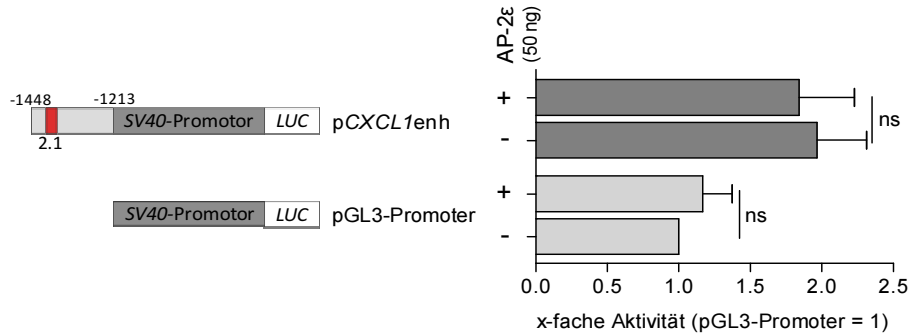


Abb. 2.4: Separate Analyse der CXCL1 Promotorsequenz um AP-2.1

Der distale Bereich des CXCL1 Promotors um die Bindestelle AP-2.1 wurde in einen pGL3-Promoter Vektor kloniert (pCXCL1enh) und die Aktivität in SW1353 Zellen bestimmt. Die Überexpression von AP-2 ϵ hatte keinen Effekt auf die Aktivität des Konstrukts. (Luziferase Assay)

Nachdem gezeigt werden konnte, dass AP-2 ϵ den CXCL1 Promotor über die Bindestelle AP-2.2 aktiviert, sollte die direkte Interaktion des Transkriptionsfaktors mit der entsprechenden DNA-Region demonstriert werden.

Dafür wurde ein EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) mit Kernextrakt aus OA-Chondrozyten und einem radioaktiv markierten Oligonukleotid mit der DNA-Sequenz des Bindemotivs AP-2.2 (4.6.4) durchgeführt (Abb. 2.5 A). Dabei bildeten sich DNA-Protein-Komplexe (Spur 2), welche durch einen Überschuss an unmarkiertem Oligonukleotid, als spezifischer Kompetitor, vollständig verdrängt wurden (Spur 3). Um zu zeigen, dass AP-2 ϵ Bestandteil dieser Komplexe ist, wurde zusätzlich ein Ansatz mit einem spezifischen Antiserum gegen AP-2 ϵ erstellt, wodurch es zur Ausbildung eines Supershifts kam (Spur 4). Bei Verwendung eines unspezifischen Kontroll-Antikörpers war dies nicht zu beobachten (Spur 5). Um neben diesem *in vitro* Ansatz auch *in vivo* die Bindung von AP-2 ϵ an den CXCL1 Promotor nachzuweisen, wurde mit DNA-Proben, gewonnen aus präzipitiertem Chromatin aus OA-Chondrozyten, eine PCR-Analyse durchgeführt. Unter Verwendung eines Primerpaares um die Bindestelle AP-2.2 (4.6.3) kam es dabei mit Chromatin, das nicht über einen Antikörper präzipitiert wurde (Input), nach einer bestimmten Zyklenzahl zur Ausbildung eines spezifischen Produkts (Spur 1) (Abb. 2.5 B). Dieses war auch bei Chromatin, welches mit einem spezifischen α -AP-2 ϵ Antiserum präzipitiert wurde, detektierbar (Spur 3), nicht jedoch bei Verwendung eines unspezifischen IgG Antikörpers (Spur 4). Dies bedeutete, dass durch das α -AP-2 ϵ Antiserum im Vergleich zur IgG-Kontrolle vermehrt Chromatin-Fragmente mit der

Bindestelle AP-2.2 angereichert wurden und somit, dass AP-2 ϵ *in vivo* innerhalb dieser Region an den *CXCL1* Promotor bindet.

Zusammengefasst ließ sich also auf mehreren Ebenen eine Interaktion von AP-2 ϵ mit dem *CXCL1* Promotor an der Bindestelle AP-2.2 nachweisen. Dies führt nach Überexpression des Transkriptionsfaktors zu einer Zunahme der Aktivität des Promotors und folglich zu einer erhöhten Konzentration intrazellulärer *CXCL1* mRNA. Somit konnte *CXCL1* als Zielgen von AP-2 ϵ in humanen Chondrozyten bestätigt werden. Diese Daten wurden 2011 im Wissenschaftsjournal „Osteoarthritis and Cartilage“ in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Wenke veröffentlicht (Wenke *et al.*, 2011).

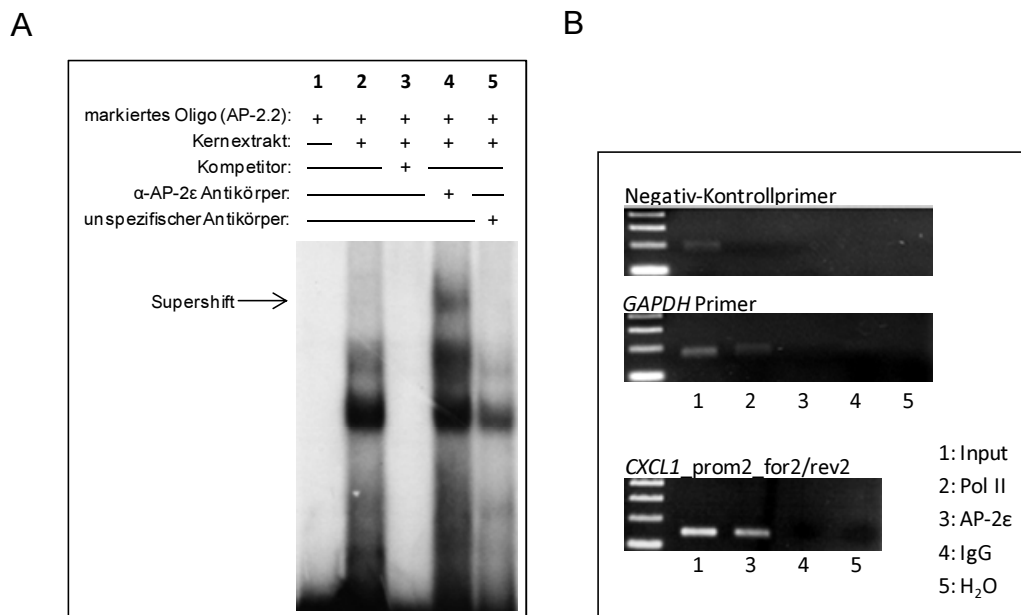


Abb. 2.5: Nachweis der direkten Interaktion zwischen AP-2 ϵ und dem *CXCL1* Promotor an AP-2.2

(A) Kernextrakt aus OA-Chondrozyten wurde mit der *CXCL1* Promotorsequenz um das Bindemotiv AP-2.2 inkubiert. Dabei kam es zur Ausbildung von DNA-Protein-Komplexen (Spur 2), die sich durch einen 400-fachen Überschuss an unmarkierten Oligonukleotiden vollständig verdrängen ließen (Spur 3). Die Inkubation mit einem spezifischen α -AP-2 ϵ Antiserum führte zu einem Supershift (Spur 4), welcher bei Verwendung eines unspezifischen Antikörpers nicht auftrat (Spur 5). (B) DNA-Proben aus fragmentiertem Chromatin aus OA-Chondrozyten (Input), welches über einen α -RNA-Polymerase II (Pol II), α -AP-2 ϵ (AP-2 ϵ) bzw. unspezifischen IgG Antikörper präzipitiert wurde, wurden in PCR-Reaktionen eingesetzt. Beim Input kam es mit allen Primerpaaren zur Amplifikation spezifischer Fragmente. Bei Verwendung der Primer *CXCL1_prom2_for2/rev2*, die das Bindemotiv AP-2.2 umspannen, konnte nach Präzipitation mit dem α -AP-2 ϵ Antikörper ein Produkt detektiert werden, nicht jedoch nach Präzipitation mit einem unspezifischen IgG Antikörper. Als Kontrolle dienten Negativ-Kontrollprimer und *GAPDH* Primer aus dem CHIP-ITTM Control Kit - Human (5.4.2). (A: EMSA; B: Chromatin-Immunpräzipitation)

2.1.2 Regulation der *COL2A1* Promotoraktivität durch AP-2ε

Neben *CXCL1* könnte auch *COL2A1*, kodierend für Typ II Kollagen, ein Zielgen von AP-2ε in humanen Chondrozyten darstellen. Ein Sequenzvergleich der Promotorregion von *COL2A1* mit Orthologen aus anderen Säugetierarten über das ECR-Browser Programm ergab, dass insbesondere die ersten 500 bp des *COL2A1* Promotors ein relativ hohes Maß an Konservierung aufweisen (Abb. 2.6). Dies macht die Lage von wichtigen, regulatorischen Elementen in diesem Bereich wahrscheinlich. Ob die Aktivität des proximalen *COL2A1* Promotors durch AP-2ε reguliert wird, wurde mit einem entsprechenden Promotorkonstrukt, welches sich über die Nukleotide von -577 bis +125 bp (relativ zum Transkriptionsstart) des *COL2A1* Gens erstreckt (p*COL2A1*prom) (4.5.1.4), in Reporterassays getestet.

Dabei konnte nach Überexpression von AP-2ε in SW1353 Zellen eine signifikante Verminderung der hervorgerufenen Luziferaseaktivität detektiert werden (Abb. 2.7 A I). Dieser Effekt war bis zu einem gewissen Punkt dosisabhängig. Während 5 ng Plasmid pro Ansatz keine messbaren Auswirkungen auf die Aktivität des *COL2A1* Promotorkonstrukts hatten, führte die Transfektion von 25 ng zu einer leichten Reduktion der Lumineszenzintensität (Abb. 2.7 A II). Ab 50 ng Plasmid-DNA pro Ansatz ließ sich ein signifikanter Abfall der Luziferaseaktivität um etwa 45 % feststellen. Jedoch kam es bei noch höheren Dosen (100/500 ng) zu einer Sättigung und der Effekt konnte nicht mehr weiter gesteigert werden.

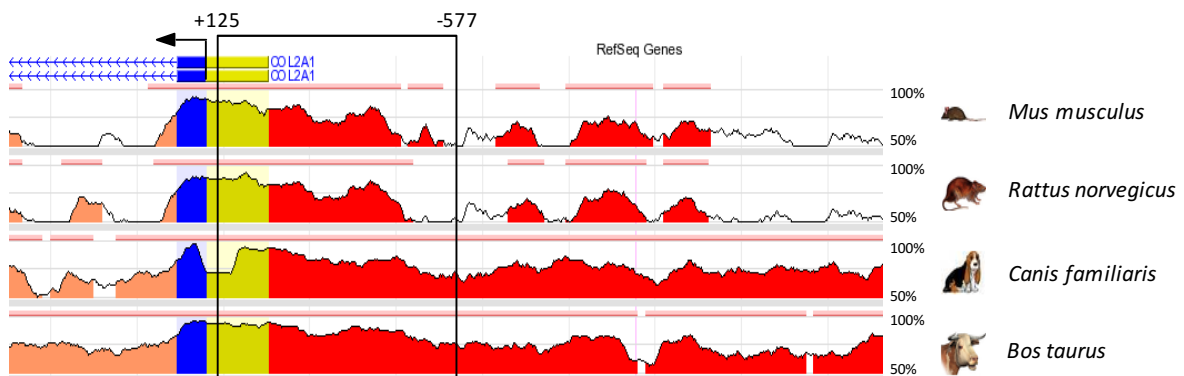


Abb. 2.6: Vergleichende Analyse der *COL2A1* Promotorsequenz in verschiedenen Spezies

Die humane DNA-Sequenz des proximalen *COL2A1* Promotors wurde mittels der ECR Browser Software mit den korrelierenden Sequenzen aus Maus, Ratte, Hund und Rind abgeglichen. Im Diagramm dargestellt sind Bereiche mit einer Sequenzübereinstimmung von mehr als 50 %. Intergenische Regionen sind rot, Aminosäure-kodierende Regionen blau, untranslatierte Regionen gelb und Introns lachsfarben hinterlegt. Evolutionär konservierte Regionen sind durch rosa Balken markiert. Die Lage des *COL2A1* Promotorfragments (-577 bis +125 bp) ist durch einen schwarzen Rahmen und der Translationsstart durch einen Pfeil symbolisiert.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die erfolgreiche Überexpression von AP-2 ϵ in SW1353 Zellen mehrmals unabhängig voneinander auf mRNA- und Protein-Ebene überprüft. Dies soll an dieser Stelle exemplarisch gezeigt werden (Abb. 2.7 B). SW1353 Zellen exprimieren natürlicherweise AP-2 ϵ (Wenke *et al.*, 2006). Die AP-2 ϵ mRNA Expression nahm nach Transfektion von 50 ng AP-2 ϵ Expressionsplasmid pro Ansatz durchschnittlich um den Faktor 8 und bei 500 ng durchschnittlich um den Faktor 100 zu (Abb. 2.7 B I). Letzteres konnte mittels Western Blot bestätigt werden (Abb. 2.7 B II), wohingegen sich niedrige AP-2 ϵ Konzentrationen (50 ng Plasmid bzw. endogenes AP-2 ϵ von SW1353) auf Protein-Ebene mit dem verfügbaren Antikörper (4.7) nicht detektieren ließen. Anschließend wurde die Expression von AP-2 ϵ in den Zellen mittels siRNA Technik herunter reguliert (Abb. 2.7 C I). Daraufhin ließ sich eine signifikante Aktivitätszunahme von pCOL2A1prom in Reportergenassays sowie ein signifikanter Anstieg der COL2A1 mRNA-Menge feststellen (Abb. 2.7 C II + III).

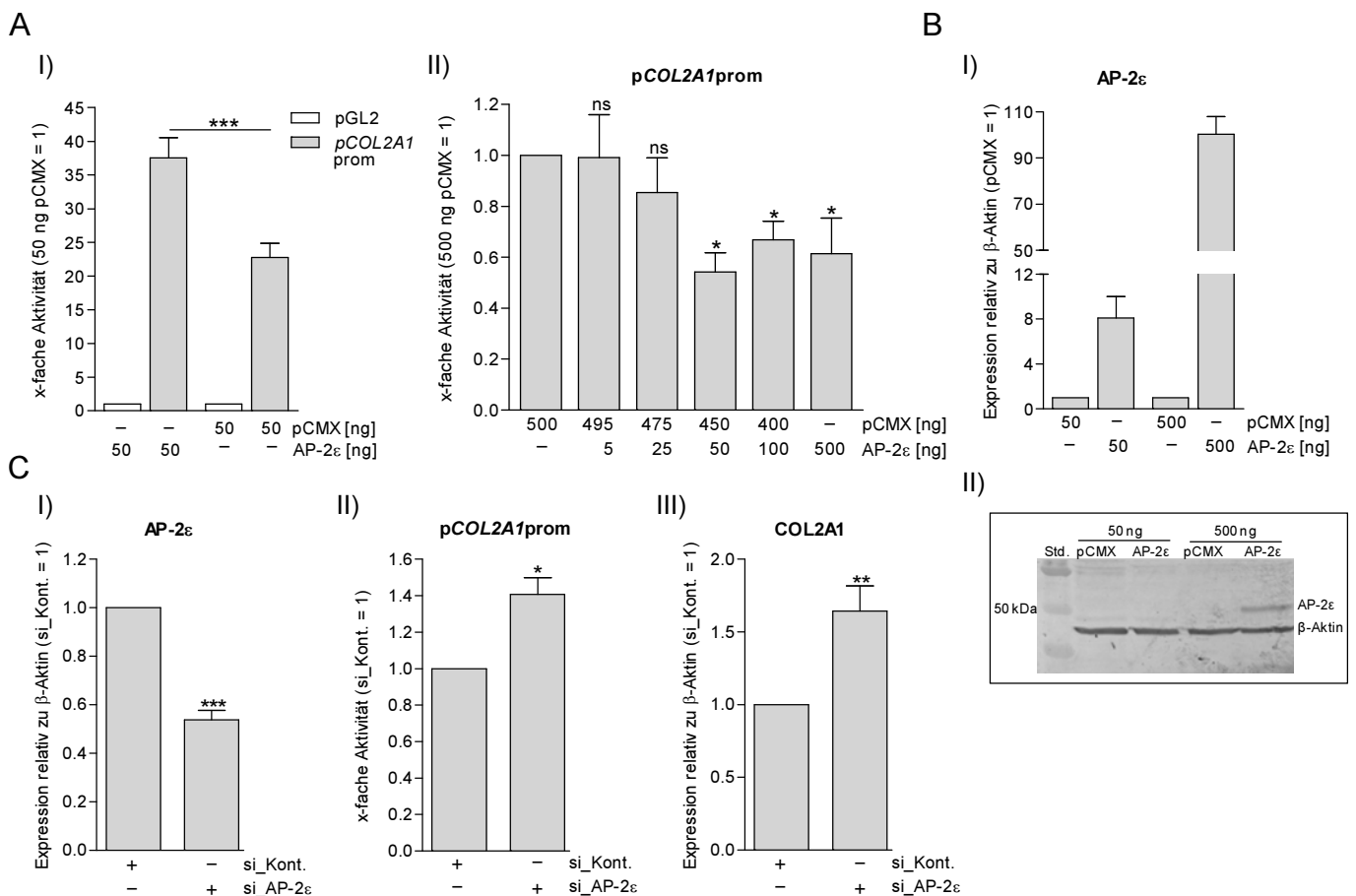


Abb. 2.7: Negative Regulation von COL2A1 durch AP-2 ϵ

(A) Die Aktivität von pCOL2A1prom wurde in SW1353 Zellen nach Überexpression von AP-2 ϵ deutlich reduziert (I). Dieser Effekt zeigte sich ab 50 ng Plasmid-DNA pro Ansatz, konnte jedoch nicht durch weitere Erhöhung der Plasmidmenge gesteigert werden (II). (B) Die Überexpression von AP-2 ϵ wurde auf mRNA- (I) und Protein-Ebene (II) verifiziert, wobei sich AP-2 ϵ im Western Blot nur bei Transfektion von 500 ng Plasmid-DNA eindeutig nachweisen ließ. (C) Die erfolgreiche Behandlung der Zellen mit siRNA

(60 pmol) gegen AP-2 ϵ wurde via qRT-PCR überprüft (I). Infolge kam es zu einer signifikanten Zunahme der *COL2A1* Promotoraktivität um ca. 45 Prozent (II) und zu einer signifikanten Zunahme der *COL2A1* mRNA-Menge (III). (A/C: Luziferase Assay bzw. qRT-PCR; B: qRT-PCR bzw. Western Blot)

Zur weiteren Charakterisierung der Regulation des *COL2A1* Promotors durch AP-2 ϵ wurde eine Reihe von Versuchen durchgeführt, die im Folgenden beschrieben sind. Zunächst wurde analysiert, ob der beobachtete Effekt spezifisch für die AP-2 ϵ Isoform ist oder auch nach Kotransfektion von Expressionsplasmiden für AP-2 α bzw. AP-2 β auftritt. Diese werden ebenfalls im Verlauf der Chondrozytendifferenzierung exprimiert (Huang *et al.*, 2004; Rock *et al.*, 2007). Wie unter Abbildung 2.8 A dargestellt, führte weder die Überexpression von AP-2 α noch - β zu einer Modulation der Aktivität des *COL2A1* Promotors. Nichtsdestotrotz stand die inhibitorische Wirkung von AP-2 ϵ in Verbindung mit der Konzentration von anderen AP-2 Isoformen. So wurde der AP-2 ϵ spezifische Effekt durch Kotransfektion gleicher oder größerer Mengen an AP-2 α interessanterweise vollständig unterdrückt (Abb. 2.8 B), was eine kompetitive Hemmung vermuten lässt.

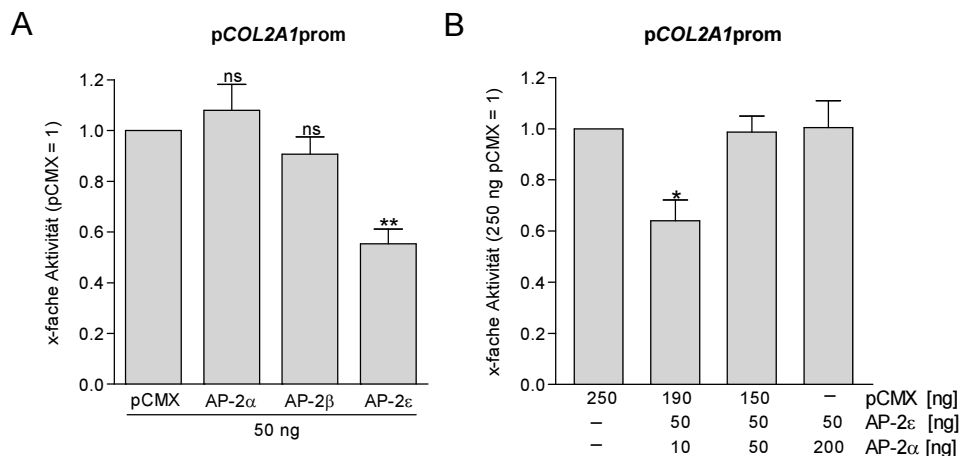


Abb. 2.8: Abhängigkeit der *COL2A1* Promotoraktivität von anderen AP-2 Isoformen

(A) Im Gegensatz zu AP-2 ϵ hatte die Überexpression von AP-2 α bzw. AP-2 β in SW1353 Zellen keinen Einfluss auf die Aktivität von *pCOL2A1prom*. (B) Verschiedene Mengen an AP-2 α Expressionsplasmid wurden zusammen mit einer konstanten Menge an AP-2 ϵ sowie *pCOL2A1prom* in SW1353 kotransfiziert. Identische oder höhere Mengen an AP-2 α negierten den Effekt von AP-2 ϵ . (A/B: Luziferase Assay)

Zur Identifikation von AP-2 Bindemotiven innerhalb der Sequenz des 702 bp langen *COL2A1* Promotorfragments wurde eine *in silico* Analyse mittels der MatInspector Software durchgeführt. Dadurch konnte ein einzelnes AP-2 Bindemotiv von -317 bis -309 bp (AP-2.1) identifiziert werden (Abb. 2.9). Ob es sich dabei tatsächlich um die verantwortliche Bindestelle für die zuvor beobachteten Effekte handelt, wurde über einen Nukleotidaustausch getestet. Überraschenderweise hatte die Mutation von AP-2.1 (*pCOL2A1prom*_AP-2.1*) (4.5.1.4) aber

weder einen Einfluss auf die Grundaktivität des Promotors noch auf den Grad der Inhibition durch AP-2ε (Abb. 2.10 A I und II).

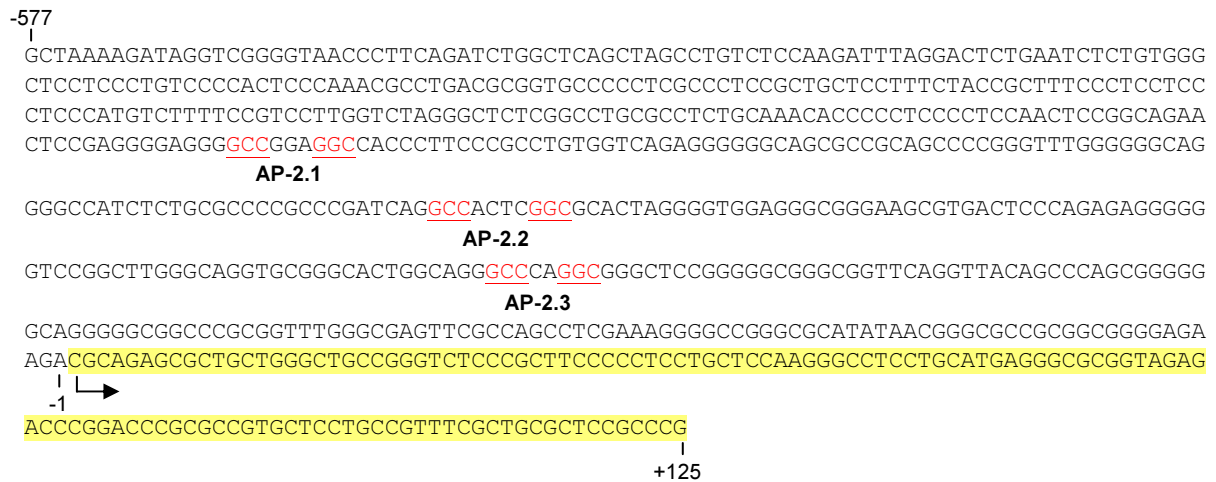


Abb. 2.9: Schematische Darstellung des analysierten 702 bp *COL2A1* Promotorfragments

Putative AP-2 Bindemotive sind rot markiert. Das klassische AP-2 Motiv AP-2.1 (-317 bis -309 bp) wurde durch die MatInspector Software identifiziert. Daneben könnten die Sequenzabschnitte AP-2.2 (-221 bis -212 bp) und AP-2.3 (-135 bis -128 bp) weitere AP-2 Bindestellen darstellen. Der 5'-untranslatierte Bereich ist gelb hinterlegt. Alle Zahlenangaben (in bp) beziehen sich auf den Transkriptionsstart (Pfeil).

Die Sequenz enthält jedoch noch ein weiteres potentiell AP-2 Motiv, das bei der *in silico* Analyse unerklärlicherweise unentdeckt blieb: AP-2.2 (-221 bis -212 bp) (Abb. 2.9). Bei diesem Motiv ist das charakteristische 5'-GCC-GGC-3' Palindrom nicht durch 3 sondern durch 4 intermediäre Basen getrennt. Diese Sequenz ist aber ebenfalls als AP-2 Bindestelle beschrieben (Mohibullah *et al.*, 1999) und wurde zuvor beim *CXCL1* Promotor durch die Software auch korrekt erkannt (vgl. Abb. 2.1). Darüber hinaus fand sich eine zusätzliche Variante des Palindroms mit 2 intermediären Basen, welche ebenfalls in der nachfolgenden Analyse betrachtet wurde: AP-2.3 (-135 bis -128 bp) (Abb. 2.9). Auch nach Mutation von AP-2.2 (p*COL2A1*prom_AP-2.2*) (4.5.1.4) ließ sich im Vergleich zum unmutierten Konstrukt aber kein verändertes Verhalten in den Reporter Assays feststellen (Abb. 2.10 A I und II). Im Gegensatz dazu kam es nach Mutation von AP-2.3 (p*COL2A1*prom_AP-2.3*) (4.5.1.4) bei Überexpression von AP-2ε interessanterweise nicht länger zu einer Inhibition des *COL2A1* Promotors (Abb. 2.10 A I). Außerdem konnte eine signifikante Abnahme der Grundaktivität des mutierten Konstrukts detektiert werden (Abb. 2.10 A II). Letzteres ist vor allem deshalb überraschend, da AP-2ε inhibitorisch auf den *COL2A1* Promotor wirkt und nach Mutation der hierfür verantwortlichen Bindestelle eine Erhöhung der Grundaktivität des Promotors zu erwarten gewesen wäre. Dieser Punkt soll unter Abschnitt 3.1 noch genauer diskutiert werden. Der direkte Vergleich der identifizierten Motive in den schon zuvor untersuchten Säugetier-

spezies (vgl. Abb. 2.6) bekräftigte, dass AP-2.3 für den AP-2ε abhängigen Effekt verantwortlich ist. Das für AP-2 Bindestellen charakteristische GCC-GGC Palindrom ist lediglich bei AP-2.3 in allen untersuchten Arten vollständig konserviert, während die palindromische Struktur von AP-2.1 und AP-2.2 in jeweils mindestens einer Art gestört ist (Abb. 2.10 B). Zur weiteren Validierung der Daten wurden diese Versuche in einer zweiten chondrozytären Zelllinie aus immortalisierten Chondrozyten (C-28/I2) wiederholt. Hier konnten im Prinzip die gleichen Resultate wie in den SW1353 Zellen generiert werden (Abb. 2.10 C I und II).

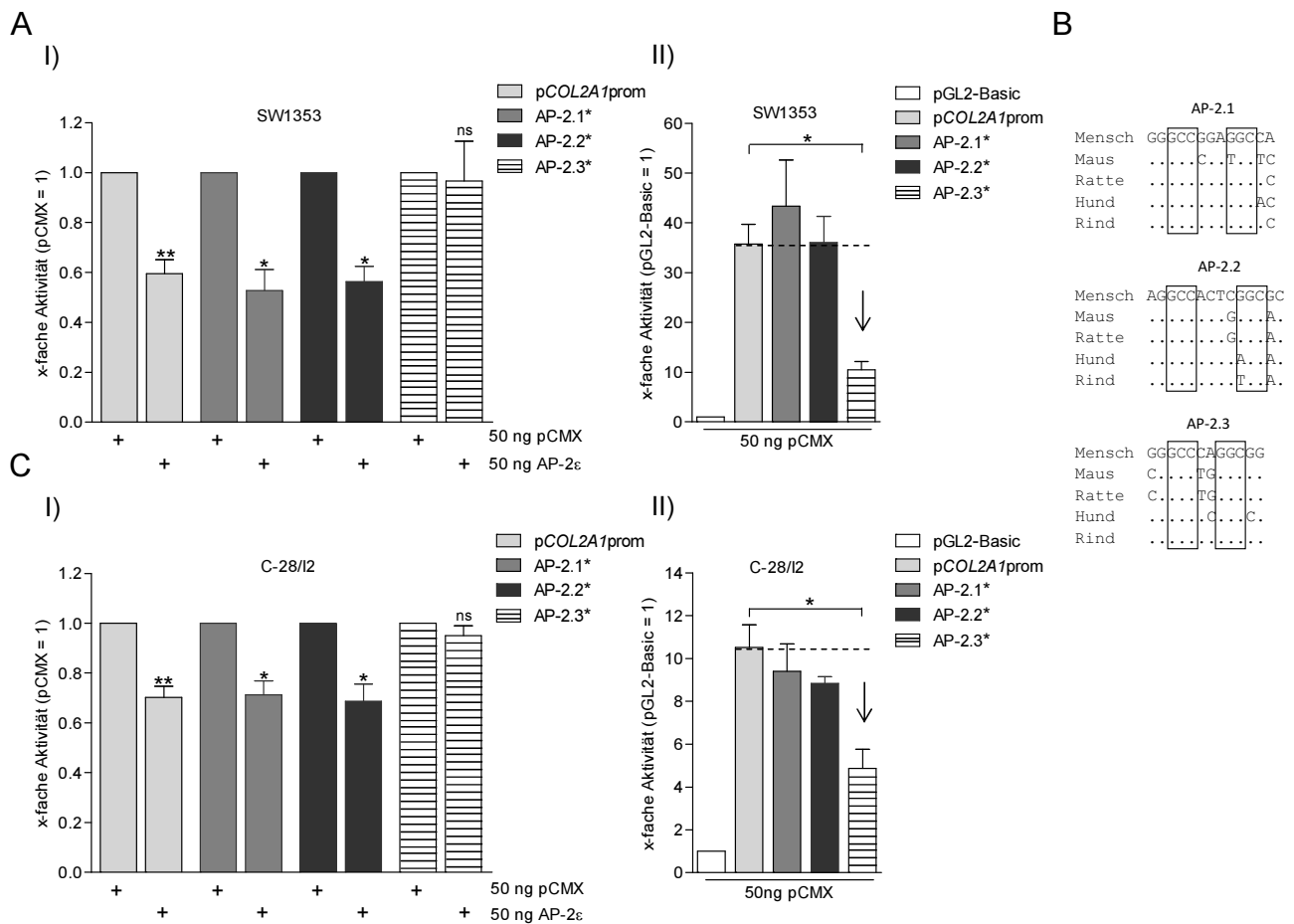


Abb. 2.10: Mutation putativer AP-2 Bindemotive in pCOL2A1prom

(A) Ein Nukleotidaustausch innerhalb von AP-2.1 in pCOL2A1prom (AP-2.1*) hatte keinen Einfluss auf den inhibitorischen Effekt von AP-2ε (I) bzw. auf die Grundaktivität des Promotorkonstrukts in Reporterassays (II). Auch nach Mutagenese von AP-2.2 (AP-2.2*) konnten keine Unterschiede im Vergleich zum unmutierten Konstrukt festgestellt werden (I + II). Demgegenüber kam es nach Mutation von AP-2.3 (AP-2.3*) nicht länger zu einer Reduktion der Luciferaseaktivität bei Kotransfektion eines Expressionsplasmids für AP-2ε (I). Überraschenderweise konnte darüber hinaus eine signifikante Abnahme der Grundaktivität des mutierten Promotorkonstrukts um etwa 65 % im Vergleich zum WT beobachtet werden (II; Pfeil). Die Versuche wurden in der Zelllinie SW1353 durchgeführt. (B) Sequenzvergleich der drei putativen AP-2 Bindemotive in verschiedenen Säugetierspezies. Das charakteristische GCC-GGC Palindrom ist nur im Fall von AP-2.3 vollständig konserviert (Punkte symbolisieren identische Basen). (C) Wiederholung der Versuche aus A in der Zelllinie C-28/I2 lieferte ähnliche Ergebnisse wie zuvor in SW1353. (A/B/D: Luciferase Assay)

Ob AP-2 ϵ *in vivo* mit der *COL2A1* Promotor-DNA am Motiv AP-2.3 interagiert, wurde mit den bereits in Abschnitt 2.1.1 beschriebenen CHIP-DNA-Proben getestet. Unter Verwendung von Primern um die Bindestelle AP-2.3 (4.6.3) kam es mit Chromatin, welches über einen α -AP-2 ϵ Antikörper präzipitiert wurde, verglichen mit der unspezifischen IgG-Kontrolle, zur Amplifikation eines PCR-Produkts (Abb. 2.11 A). Bei Primern für die Bindemotive AP-2.1 und AP-2.2 (4.6.3) war dies hingegen nicht der Fall.

Zusätzlich wurde ein EMSA mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid mit der DNA-Sequenz um das Bindemotiv AP-2.3 (4.6.4) durchgeführt (Abb. 2.11 B). Nach Inkubation mit Kernextrakt aus SW1353 Zellen, in denen AP-2 ϵ zuvor überexprimiert wurde, konnte eine Reihe von Protein-DNA-Komplexen beobachtet werden (Spur 2). Dies war ein Hinweis dafür, dass neben AP-2 ϵ weitere Proteine an den *COL2A1* Promotor innerhalb der Region um AP-2.3 binden. Nach Zugabe eines Überschusses an unmarkiertem Oligonukleotid wurden die Banden vollständig verdrängt (Spur 3). Dass AP-2 ϵ Bestandteil dieser Komplexe ist, wurde nach Inkubation mit einem spezifischen Antiserum gegen AP-2 ϵ festgestellt. Infolge konnte ein Supershift detektiert werden (Spur 4).

Aufgrund der mehreren Banden, stellte sich die Frage, ob AP-2 ϵ alleine an das Oligonukleotid bindet, oder ob die Interaktion von zusätzlichen Faktoren abhängt. Dies wurde über *in vitro* translatiertes AP-2 ϵ Protein aus Retikulozytenlysat adressiert (5.3.6). Im Vergleich zum Kontrollansatz ohne Protein (pCMX) konnte keine Veränderung des Bandenmusters nach Inkubation mit dem *in vitro* translatierten Protein im EMSA festgestellt werden (Abb. 2.11 C). Dies lässt vermuten, dass für die Interaktion von AP-2 ϵ mit dem *COL2A1* Promotor mindestens ein zusätzlicher Faktor nötig ist, der in den Retikulozytenlysaten nicht enthalten ist.

Um die Ergebnisse neben der Chromatin-Immunpräzipitation über einen weiteren *in vivo* Ansatz zu überprüfen, wurde die *Col2a1* mRNA-Expression in verschiedenen Knorpelgewebeproben aus AP-2 ϵ defizienten Mäusen (*Tfap2e* $-/-$) und WT Mäusen verglichen. Dabei ließ sich in Epiphysenknorpel aus neugeborenen Mäusen, in dem *Col2a1* wie erwartet stark exprimiert wurde, eine im Durchschnitt 2-fach erhöhte Expressionsrate von *Col2a1* in den *Tfap2e* $-/-$ Mäusen im Vergleich zu den WT Tieren feststellen (Abb. 2.12). Bei Proben aus embryonalen Extremitätenknospen und adultem Gelenkknorpel, in denen natürlicherweise nur eine vergleichsweise sehr geringe *Col2a1* Expression vorlag, konnte dies hingegen nicht beobachtet werden. Diese Ergebnisse wurden 2013 im Wissenschaftsjournal „The FEBS Journal“ veröffentlicht (Niebler und Bosserhoff, 2013).

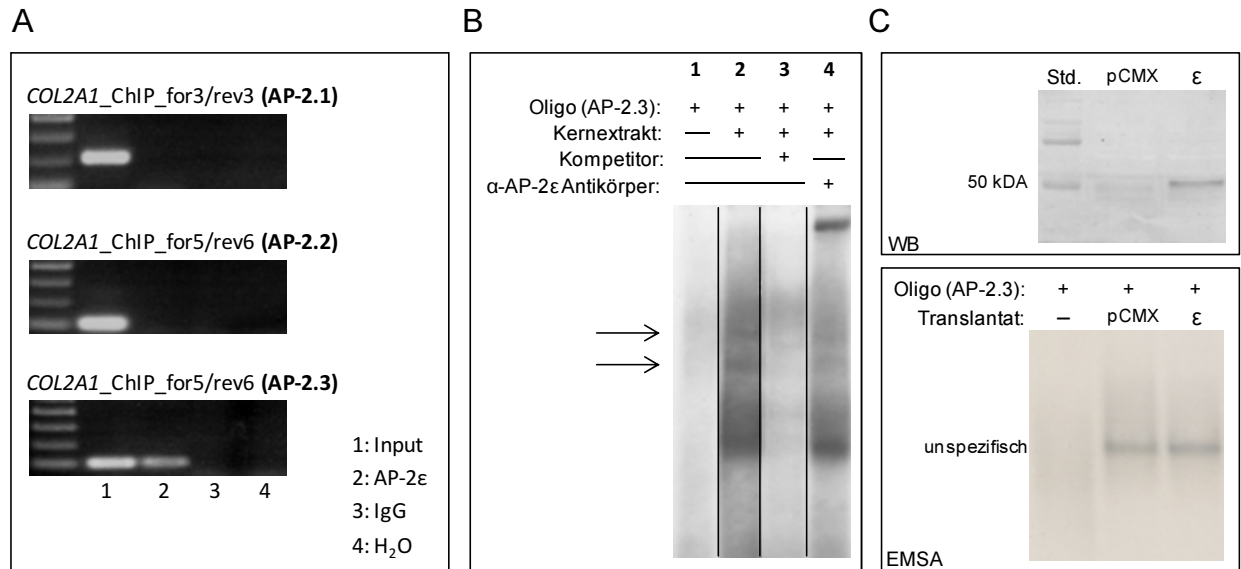


Abb. 2.11: Nachweis der Interaktion zwischen AP-2ε und dem COL2A1 Promotor

(A) Fragmentiertes Chromatin aus OA-Chondrozyten (Input), welches über einen α-AP-2ε bzw. unspezifischen IgG Antikörper präzipitiert wurde, wurden in PCR-Reaktionen eingesetzt. Beim Input kam es mit allen Primerpaaren zur Amplifikation spezifischer Fragmente. Bei Verwendung des Primerpaars COL2A1_ChIP_for5/rev6, welches das Bindemotiv AP-2.3 im COL2A1 Promotor umfasst, konnte nach Präzipitation mit dem α-AP-2ε Antikörper ein Produkt detektiert werden, nicht jedoch bei Präzipitation mit einem unspezifischen IgG Antikörper. Mit Primerpaaren für die Bindemotive AP-2.1 bzw. AP-2.2 wurden nach den Präzipitationen keinerlei Produkte generiert. Für die zugehörigen Kontrollreaktionen vergleiche Abb. 2.5. (B) Kernextrakt aus SW1353 Zellen, welche zuvor mit einem Expressionsplasmid für AP-2ε transfiziert wurden, wurde mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden für das Bindemotiv AP-2.3 inkubiert. Dabei kam es zur Ausbildung mehrerer DNA-Protein-Komplexe (Spur 2), die sich durch einen 400-fachen Überschuss an unmarkierten Oligonukleotiden verdrängen ließen (Spur 3). Nach Inkubation mit einem spezifischen α-AP-2ε Antiserum wurde ein Teil der Komplexe (Pfeile) zu einem Supershift retardiert (Spur 4). (C) Oben: Die erfolgreiche *in vitro* Translation von AP-2ε wurde mittels Western Blot überprüft. Beim Kontrollvektor pCMX wurde kein AP-2ε Protein synthetisiert. Unten: Die *in vitro* Translatate wurden mit den gleichen Oligonukleotiden wie in B inkubiert und das Bindeverhalten im EMSA analysiert. Es konnte bei diesem Versuchsaufbau keine Bindung von AP-2ε an das Oligonukleotid festgestellt werden. (A: Chromatin-Immunpräzipitation; B: EMSA, die dargestellten Spuren stammen alle von demselben Gel; C: Western Blot, EMSA)

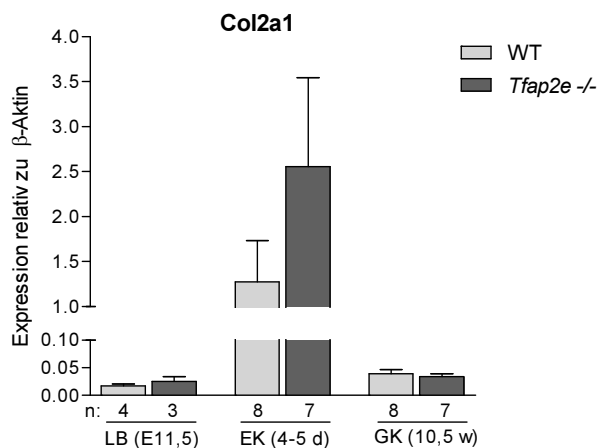


Abb. 2.12: Col2a1 Expression in Knorpelgewebeproben aus WT und Tlap2e^{-/-} Mäusen

Die Col2a1 mRNA-Expression wurde in embryonalen Extremitätenknospen bzw. *limb buds* (LB), Epiphysenknorpel (EK) aus neugeborenen Mäusen und Gelenknorpel (GK) aus adulten Tieren bestimmt. Dabei konnte bei beiden Genotypen im Epiphysenknorpel aus neugeborenen Mäusen im Vergleich zu den anderen beiden Gewebetypen eine stark erhöhte Col2a1 mRNA-Expression detektiert werden. Darüber hinaus war hier die Col2a1 Expression in AP-2ε defizienten Mäusen in etwa doppelt so hoch wie in WT Mäusen. (qRT-PCR, die n-Zahlen spiegeln bei LB einzelne Würfe und bei EK bzw. GK einzelne Mäuse wider)

2.2 Analyse der embryonalen Skelettentwicklung in der *Tfap2e* ^{-/-} Maus

Adulte *Tfap2e* *knockout* Mäuse (4.3.2) sind lebensfähig und zeigen äußerlich betrachtet keinen anormalen Phänotyp. In einer früheren Analyse aus unserer Arbeitsgruppe wurde die Expression von AP-2 ϵ im hypertrophen Knorpel von E14,5 Tage alten Mausembryonen über immunhistochemische Färbung nachgewiesen (Wenke *et al.*, 2009). Falls AP-2 ϵ die embryonale Skelettentwicklung beeinflusst, wäre zu erwarten, dass bei den AP-2 ϵ defizienten Mausföten in den nachfolgenden Embryonalstadien transiente Entwicklungsstörungen auftreten. Deshalb wurde im Folgenden die Skelettentwicklung an 15,5 bzw. 16,5 Tagen alten *Tfap2e* ^{-/-} Mausföten im Vergleich zum WT analysiert, um so Rückschlüsse auf die Funktion von AP-2 ϵ in der Chondrogenese zu gewinnen. Später in der Entwicklung könnten temporäre Anomalitäten durch unbekannte Mechanismen kompensiert werden, so dass adulte *Tfap2e* ^{-/-} Mäuse phänotypisch wieder normal erscheinen.

Um so weit wie möglich zu gewährleisten, dass sich die hierfür nötigen WT und *Tfap2e* *knockout* Föten in der gleichen Entwicklungsstufe befinden und Einflüsse aufgrund von unterschiedlichem Alter sowie Größe und Gewicht der Mutter auszuschließen, wurden heterozygote Elterntiere verpaart und jeweils die, aus demselben Wurf gewonnenen, homozygoten Föten miteinander verglichen. Bezüglich Größe und Gewicht der Embryonen konnten dabei an beiden Zeitpunkten keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden (Abb. 2.13 A). Um die embryonale Skelett- bzw. Extremitätenentwicklung genauer zu untersuchen, wurden die Hinterläufe der Embryonen separat in Paraffin eingebettet und an Dünnschnitten *in situ* Hybridisierungen gegen die mRNA-Transkripte der chondrozytären Differenzierungsmarkergene *Col2a1* und *Col10a1* durchgeführt (Abb. 2.13 B I). Danach wurden die mRNA-Expressionszonen der beiden Gene sowie die kalzifizierte Region in der Diaphyse vermessen und auf die *Femur*-Gesamtlänge bezogen. Die distalen und proximalen Expressionszonen eines Gens wurden dazu zuvor addiert. Außerdem wurden nur Dünnschnitte verwendet, bei denen sich die *Femora* ungefähr in der gleichen Schnittebene befanden.

Wie unter Abbildung 2.13 B dargestellt waren die durchschnittliche Gesamtlänge der *Femora* (Abb. 2.13 B II) sowie die Ausdehnung der relativen *Col2a1* (Abb. 2.13 B III) mRNA-Expressionszone bei WT und *Tfap2e* ^{-/-} Föten in etwa identisch. Bezüglich *Col10a1* konnte in den *Tfap2e* ^{-/-} Föten am Embryonaltag 16,5 eine geringgradig aber signifikant expandierte Expressionszone detektiert werden (Abb. 2.13 B IV), was mit einer tendenziell kleineren kalzifizierten Region einherging (Abb. 2.13 B V).

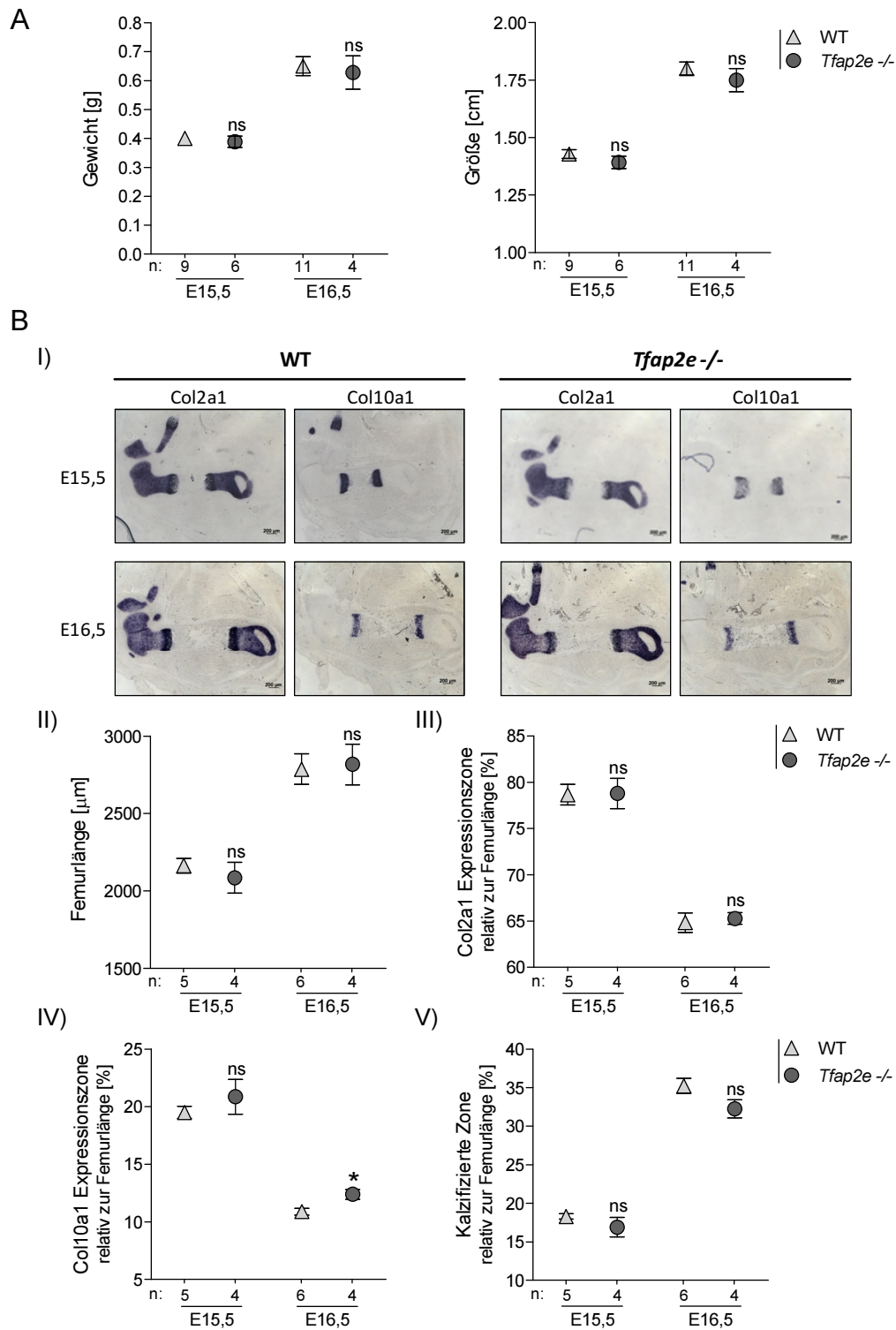


Abb. 2.13: Vergleich der embryonalen Skelettentwicklung in E15,5/16,5 WT und *Tfap2e*^{-/-} Mäusen
(A) Das Gewicht bzw. die Größe von 15,5 bzw. 16,5 Tage alten WT und *Tfap2e*^{-/-} Föten aus jeweils 3 unabhängigen Heterozygotenwürfen pro Zeitpunkt war ungefähr identisch. **(B)** *In situ* Hybridisierung gegen Col2a1 und Col10a1 an den Hinterläufen von Föten aus A (I) und Vermessung der Femur-Länge (II), der Col2a1 (III) bzw. Col10a1 (IV) mRNA-Expressionszonen sowie der kalzifizierten Region (V) (die Letzteren jeweils bezogen auf die Femur-Länge). Bis auf eine leicht vergrößerte relative Col10a1 Expressionszone an Embryonaltag 16,5 konnten bei *Tfap2e*^{-/-} Föten in diesen Entwicklungsstadien keine signifikanten Hinweise für eine anormale Skelettentwicklung festgestellt werden. (A/B: Die n-Zahlen spiegeln einzelne Föten wider)

Um zu analysieren, ob AP-2 ϵ an früheren Abschnitten der Embryogenese einen größeren Einfluss auf die Skelettentwicklung hat, wurden die mesenchymalen Extremitätenknospen von 11,5 Tage alten Embryonen isoliert, zu Einzelzellen disseminiert und diese anschließend in dreidimensionalen *Micromass*- bzw. Hochdichtekulturen (5.6.5) *in vitro* weiter differenziert. Dadurch werden in den mesenchymalen Zellen chondrogene Differenzierungsprozesse induziert, welche in Form von lokal begrenzten Knötchen (*nodules*) nach Behandlung mit Alcian Blau Lösung sichtbar gemacht werden können (Ahrens *et al.*, 1977; DeLise *et al.*, 2000b; Handschel *et al.*, 2007).

Diese waren erstmals nach zwei Tagen zu beobachten, wobei deren Anzahl, Größe und Farbintensität im weiteren Verlauf der Kultivierung deutlich zunahm (Abb. 2.14 A). Zwischen *Tfap2e* $-/-$ und WT Zellen konnten diesbezüglich jedoch keine prägnanten Unterschiede festgestellt werden.

Neben dieser rein phänotypischen Analyse wurde das Differenzierungsverhalten in den Kulturen zusätzlich über das Expressionsmuster der Knorpeldifferenzierungsmarkergene *Aggrecan*, *Col2a1*, *Col10a1* und *Mmp13* untersucht (Lefebvre und Smits, 2005; Goldring *et al.*, 2006) (Abb. 2.14 B). Die Expression aller vier Gene nahm im Verlauf der Differenzierung stark zu, aber auch hier wurden keine grundlegenden Differenzen zwischen den beiden Genotypen deutlich. Allerdings gab es bei *Tfap2e* $-/-$ Zellen eine Tendenz zu einer erhöhten *Col2a1*, *Col10a1* und *Mmp13* Expression am Ende der Kultivierung (Abb. 2.14 B II, III und IV).

Dass AP-2 ϵ in den WT Föten bereits zu diesem frühen Zeitpunkt der Gliedmaßenentwicklung exprimiert wird, konnte über qRT-PCR mittels spezifischer Primer nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4.1 unter 4.3.2). Allerdings war die Expression von AP-2 ϵ in den mesenchymalen Zellen der Extremitätenknospen im Vergleich zu stärker differenzierten Chondrozyten relativ niedrig (vgl. Abb. 2.15).

Zusammengefasst ließen sich bei der AP-2 ϵ defizienten Maus im Bezug auf die embryonale Skelettentwicklung an den analysierten Zeitpunkten im Vergleich zu WT Tieren also keine bis lediglich geringe Anomalitäten feststellen. Letztere scheinen nur in stark differenzierten Knorpelzellen aufzutreten, was möglicherweise redundanten Kompensationsmechanismen in früheren Stadien der Chondrozytendifferenzierung geschuldet ist.

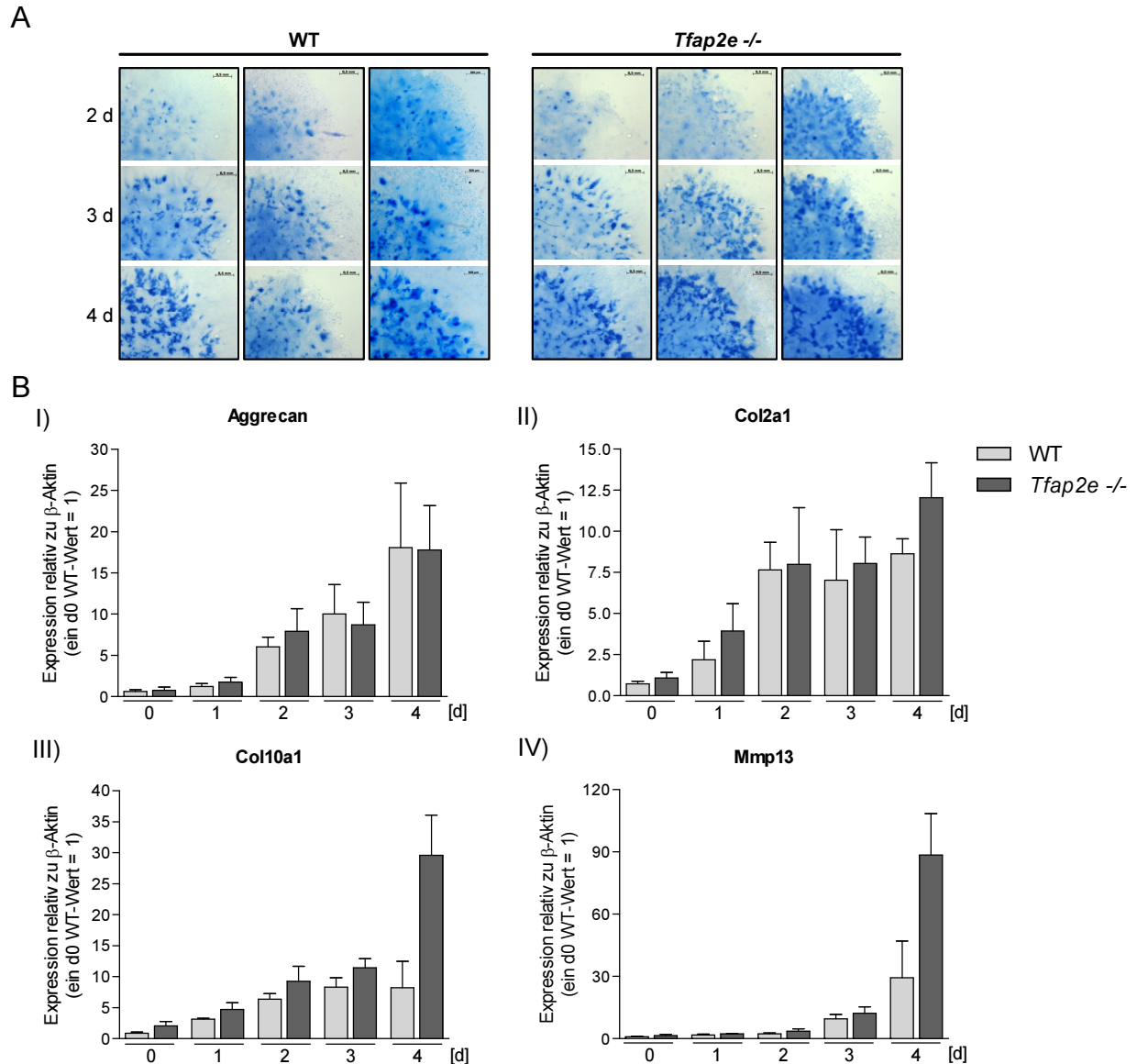


Abb. 2.14: *In vitro* Differenzierung embryonaler *limb bud* Zellen über *Micromass*-Kultivierung

Micromass-Kulturen aus den disseminierten Extremitätenknospen 11,5 Tage alter WT und *Tfap2e*^{-/-} Embryonen wurden für insgesamt 4 Tage *in vitro* kultiviert. Pro Genotyp wurden je 3 unabhängige Würfe verwendet (12 bis 24 Knospen pro Wurf). **(A)** Um das Differenzierungsverhalten von WT und *Tfap2e*^{-/-} Zellen zu vergleichen, wurde täglich eine Kultur mit Alcian Blau Lösung behandelt. Die typischen Knötchen (*nodules*) waren jeweils ab dem zweiten Tag der Kultivierung sichtbar und deren Anzahl, Größe und Farbintensität stieg bei den WT und *Tfap2e*^{-/-} Kulturen in etwa gleich stark an. **(B)** Daneben wurde 6 h nach Aussaat (d0) sowie an jedem Folgetag die mRNA-Expression von Aggrecan, Col2a1, Col10a1 und Mmp13 analysiert. Bis auf eine tendenziell erhöhte Col2a1 (II), Col10a1 (III) und Mmp13 (IV) Expressionsrate an Tag 4 der Differenzierung wurden in *Tfap2e*^{-/-} im Vergleich zu WT Zellen keine deutlichen Abweichungen im Expressionsmuster der Gene festgestellt. (A: Alcian Blau Färbung; B: qRT-PCR)

2.3 Induktion der AP-2 ϵ Expression durch Hypoxie

Im weiteren Verlauf der Analyse wurde die Expression von AP-2 ϵ auch post-embryonal in Chondrozyten aus dem *Femur*-Epiphysenknorpel von neugeborenen Mäusen (4-5 Tage), kurz vor Ausbildung der sekundären, intraepiphysealen Ossifikationszentren (Chen *et al.*, 2008), bestimmt. Interessanterweise konnte hier bei den WT Tieren ein starker Anstieg der AP-2 ϵ Expression im Vergleich zu den mesenchymalen Zellen der Extremitätenknospen detektiert werden (Abb. 2.15).

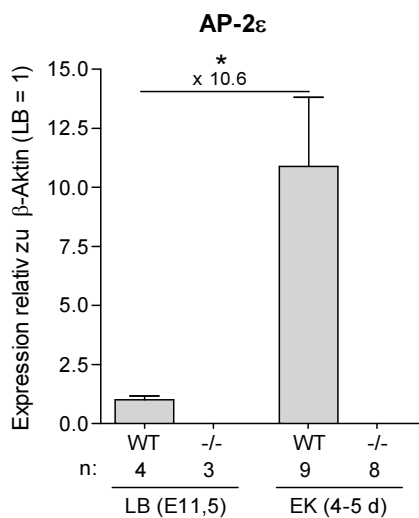


Abb. 2.15: AP-2 ϵ Expression in Gewebeproben aus frühen und späten Stadien der murinen Gliedmaßenentwicklung

Die AP-2 ϵ mRNA-Expression wurde in den Extremitätenknospen (LB) von 11,5 Tage alten Mausembryonen sowie in differenzierten Chondrozyten aus dem *Femur*-Epiphysenknorpel (EK) von neugeborenen Mäusen bestimmt. Dabei konnte bei den WT Tieren eine signifikante Zunahme der AP-2 ϵ Expression detektiert werden. Bei *Tfap2e* *-/-* Mäusen als Negativkontrolle ließ sich keine AP-2 ϵ mRNA nachweisen. (qRT-PCR, die n-Zahlen spiegeln bei LB einzelne Würfe und bei EK einzelne Mäuse wider)

Aufgrund dieser Beobachtung ergaben sich zwei neue Fragestellungen:

1. Treten bei *Tfap2e* *knockout* Mäusen nach der Geburt bzw. im adulten Tier strukturelle Abnormalitäten im Knorpelgewebe oder Veränderungen in der Knorpelhomöostase auf, die zwar phänotypisch von außen nicht sichtbar sind, aber über eine detailliertere Analyse aufgedeckt werden können? Diese Fragen wird unter Abschnitt 2.4 und 2.5 behandelt.
2. Welche Stimuli sind für die Induktion der AP-2 ϵ Expression im Verlauf der Extremitätenentwicklung verantwortlich? Dieser Punkt wird im Folgenden adressiert.

Neben endogenen Faktoren wie Signalmolekülen und ECM-Komponenten spielen physikalische Stimuli wie Hypoxie oder das biomechanische Umfeld eine wichtige Rolle bei der regelrechten Knorpel- und Skelettentwicklung in den Extremitäten (Schipani, 2005; Amarilio *et al.*, 2007; Provot *et al.*, 2007; Kelly und Jacobs, 2010; Responde *et al.*, 2012). Aufgrund der großen Zahl an möglichen Regulationsmechanismen wurde im Rahmen dieser Arbeit der Fokus darauf gelegt, zu analysieren, ob die Expression von AP-2 ϵ von einem dieser beiden physikalischen Stimuli abhängt. Dazu wurden zuerst dreidimensionale Zellaggregate in einer *in vitro* Druckapparatur an der Abteilung für Unfallchirurgie des Uni-Klinikums

Regensburg nach einem etablierten Protokoll (5.5.5 und 5.5.6) zyklisch, hydrostatisch belastet. Aufgrund der für diesen Versuch notwendigen hohen Zellzahlen wurden statt murinen Knorpelzellen humane Stammzellen eingesetzt und diese während des Versuchs in chondrogenem Differenzierungsmedium (4.8.1) kultiviert. Dazu wurden hMSC-Sphäroide an Tag 1 bis 6 täglich für 4 Stunden belastet und an Tag 7, 14 und 21 für die Isolation von RNA geerntet. Im Vergleich zu entsprechenden, unbelasteten Kontrollen kam es nach der Belastung zu keiner deutlichen bzw. einheitlichen Veränderung der AP-2 ϵ mRNA-Expression (Abb. 2.16 A). Selbiges Ergebnis ergab sich bezüglich der Knorpeldifferenzierungsmarker SOX9 und MIA/CD-RAP (Lefebvre und Smits, 2005). Dass der Versuch methodisch valide war, wurde durch Analyse der COL2A1 mRNA-Expression als Positivkontrolle verifiziert. Wie erwartet, konnte bei den belasteten Proben an allen drei Zeitpunkten eine deutliche Anreicherung der COL2A1 mRNA detektiert werden (Angele *et al.*, 2004).

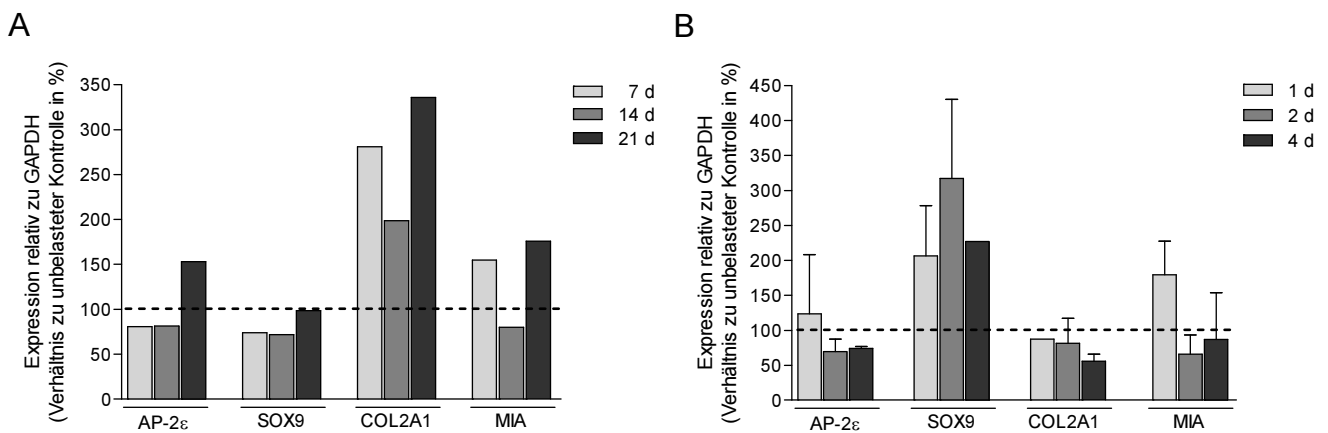


Abb. 2.16: AP-2 ϵ Expressionsanalyse nach hydrostatischer *in vitro* Belastung

hMSC Zellaggregate wurden täglich für 4 h zyklisch, hydrostatisch belastet. Pro Zeitpunkt wurden je mindestens 6 Sphäroide für die Isolation von gesamtzellulärer RNA geerntet. Entsprechende Kontrollen wurden identisch kultiviert, jedoch nicht in der Belastungsapparatur inkubiert. **(A)** Die Belastung von Zellen eines Spenders wurde an Tag 1 bis 6 und die RNA-Extraktion an Tag 7, 14 und 21 durchgeführt (n=1). Zur Validierung des Experiments wurde die Expression von COL2A1 bestimmt. Im Gegensatz zu COL2A1 kam es bei AP-2 ϵ , sowie bei SOX9 und MIA/CD-RAP im Vergleich zu den unbelasteten Proben nicht zu einer einheitlichen Steigerung der mRNA-Expression. **(B)** Zur Analyse von potentiellen Kurzzeiteffekten wurden Zellaggregate zweier Spender an Tag 1 bis 4 belastet und RNA an Tag 1, 2 und 4 nach einer Ruhephase von jeweils 2 h isoliert (n=2). Bei diesem Versuchsaufbau konnte nur bei SOX9 eine deutliche Zunahme der mRNA-Expression infolge der Belastung festgestellt werden. (A/B: qRT-PCR)

Da es denkbar wäre, dass AP-2 ϵ als Transkriptionsfaktor nur transient reguliert wird und die Expression nach Wegfall des hydrostatischen Stimulus wieder relativ schnell auf das Ausgangslevel zurückgeht, wurde der Versuch noch einmal mit kürzeren Zeitintervallen zwischen Belastung und Probenentnahme wiederholt. Dafür wurden die Zellaggregate

wiederum täglich für vier Stunden belastet aber dieses Mal direkt an Tag 1, 2 und 4 Sphäroide für die RNA-Isolation entnommen. Im Gegensatz zum vorherigen Durchgang wurde die Expression von COL2A1 an diesen frühen Zeitpunkten (noch) nicht durch die hydrostatische Belastung hochreguliert (Abb. 2.16 B). Demgegenüber kam es beim Transkriptionsfaktor SOX9 zu einer deutlichen Induktion der mRNA-Expression, was bei AP-2 ϵ aber erneut nicht der Fall war. Aufgrund dieser beiden *in vitro* Versuche erschien eine grundlegende Regulation des Gens für AP-2 ϵ durch mechanosensitive Signaltransduktionswege unwahrscheinlich.

Im Anschluss wurde der Einfluss hypoxischer Bedingungen auf die Expressionsrate von AP-2 ϵ genauer analysiert. Dazu wurde zunächst die Expression des Hypoxiemarkergens *Angptl4* (*angiopoietin-like 4*) in den bereits zuvor verwendeten murinen Gewebeproben bestimmt (vgl. Abb. 2.15) (Murata *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012). Dabei konnte, analog zu AP-2 ϵ , eine signifikante Zunahme der Angptl4 mRNA-Expression im Epiphysenknorpel aus neugeborenen Mäusen gegenüber den frühen embryonalen Extremitätenknospen detektiert werden (Abb. 2.17 A). Zusätzlich wiesen die Expressionsmuster der beiden Gene bei der *in vitro* Differenzierung von dreidimensionalen Stammzellaggregaten (5.5.5) ein hohes Maß an Übereinstimmung auf (Abb. 2.17 B I und II). Dies waren erste Hinweise, dass die Expression von AP-2 ϵ in Knorpelzellen durch Hypoxie als externen Stimulus induziert werden könnte.

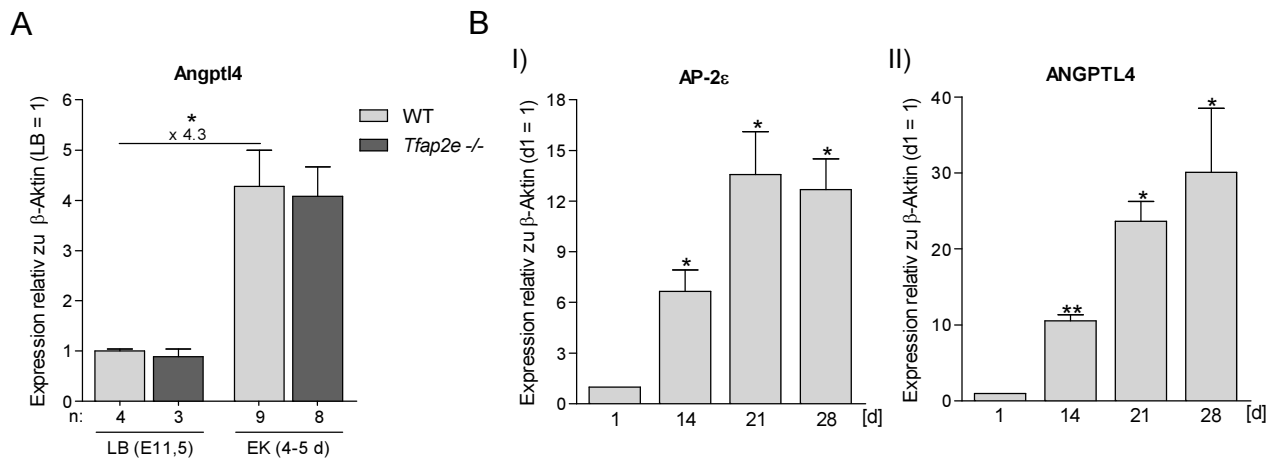


Abb. 2.17: Korrelation der Expression von AP-2 ϵ und ANGPTL4

(A) Die Expression von Angptl4 wurde in den gleichen murinen Gewebeproben wie unter Abb. 2.15 bestimmt. Dabei konnte bei den WT Tieren, wie zuvor auch für AP-2 ϵ beobachtet, eine signifikante Zunahme der Angptl4 mRNA-Expression im Epiphysenknorpel festgestellt werden. Das Gleiche war bei *Tfap2e* knockout Tieren der Fall. LB: Extremitätenknospen, EK: Epiphysenknorpel. **(B)** hMSC-Sphäroide aus Zellen von drei verschiedenen Spendern wurden in chondrogenem Differenzierungsmedium über einen Zeitraum von vier Wochen kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Sphäroide für die Isolation von RNA geerntet und die Expression von AP-2 ϵ (I) und ANGPTL4 (II) verglichen, wobei eine deutliche Korrelation auftrat. (A/B: qRT-PCR)

Um dies zu verifizieren, wurde in den folgenden Experimenten die intrazelluläre Konzentration bzw. Aktivität des Transkriptionsfaktorkomplexes HIF-1, dem primären Mediator zellulärer Adaptionsvorgänge an Sauerstoffmangelsituationen, bestehend aus den Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β (Wang *et al.*, 1995), moduliert.

Zunächst wurden murine mesenchymale Stammzellen (mMSC, engl. *murine mesenchymal stem cells*) aus WT Tieren mit den Hypoxie-simulierenden Eisenchelatoren 2,2'-Dipyridyl (DP) und Desferrioxamin (DFX) behandelt, wodurch es zur Inaktivierung von Fe₂-abhängigen Prolyl Hydroxylasen (PHD) und folglich zur posttranskriptionellen Akkumulation von HIF-1 α kommt (Kallio *et al.*, 1999; Woo *et al.*, 2006). Hierfür wurden mMSC als chondrogenes Modellsystem eingesetzt, da diese unter normalen Kultivierungsbedingungen (Normoxie und 2-dimensionales Wachstum) nur ein vergleichsweise geringes Level an HIF-1 α Protein aufweisen und sich somit gut zur Beobachtung von Effekten nach Hypoxie-Induktion eignen (vgl. Abb. 2.19).

Interessanterweise konnte nach den Behandlungen jeweils ein signifikanter Anstieg der AP-2 ϵ mRNA-Expression im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen beobachtet werden (Abb. 2.18 A). Wie erwartet, wurde auch die Expressionsrate von Angptl4 stark hochreguliert (Abb. 2.18 B). Andererseits blieb der Expressionsgrad von MIA/CD-RAP unbeeinflusst und fungierte deshalb hier und in den folgenden Hypoxie-Versuchen als Negativkontrolle (Abb. 2.18 C). Die DP bzw. DFX vermittelte intrazelluläre Anhäufung von HIF-1 α konnte mittels Western Blot verifiziert werden (Abb. 2.18 D). Diesbezüglich ist anzumerken, dass sich nicht die Intensität der bereits in den Kontrollen vorhandenen Bande veränderte, sondern infolge der Behandlungen darüber eine neue, relativ breite Bande sichtbar wurde. Die vertikale Ausdehnung der Bande könnte durch die hohe Konzentration von HIF-1 α nach der Behandlung oder durch den sehr Harnstoff-reichen HIF RIPA Puffer (4.8.3.3) bedingt sein. Dass diese Bande aber HIF-1 α darstellen muss, bestätigte sich in den nachfolgenden Versuchen (vgl. Abb. 2.20 E / Abb. 2.21 D). Als zusätzliche Kontrolle wurde parallel die gesteigerte transkriptionelle Aktivität des HIF-1 Proteinkomplexes im Zellkern mit einem Reportergenkonstrukt (4.5.1.3) mit sechs konsekutiven HIF-1 Bindestellen bzw. HRE Motiven (engl. *hypoxia-responsive element*) nachgewiesen. Die Zugabe von DP bzw. DFX resultierte in einer starken Zunahme der Aktivität des Konstrukts in Luziferaseassays (Abb. 2.18 E).

Für den Gegenbeweis wurde die intrazelluläre Konzentration von HIF-1 α mittels siRNA-Technik herunter reguliert. Hierfür wurden SW1353 Zellen verwendet, da diese unter normalen Kultivierungsbedingungen (21 % Sauerstoff) eine deutlich höhere Proteinkonzentration an HIF-1 α aufweisen als mMSC und deshalb für einen *knockdown* von HIF-1 α besser geeignet sind (Abb. 2.19).

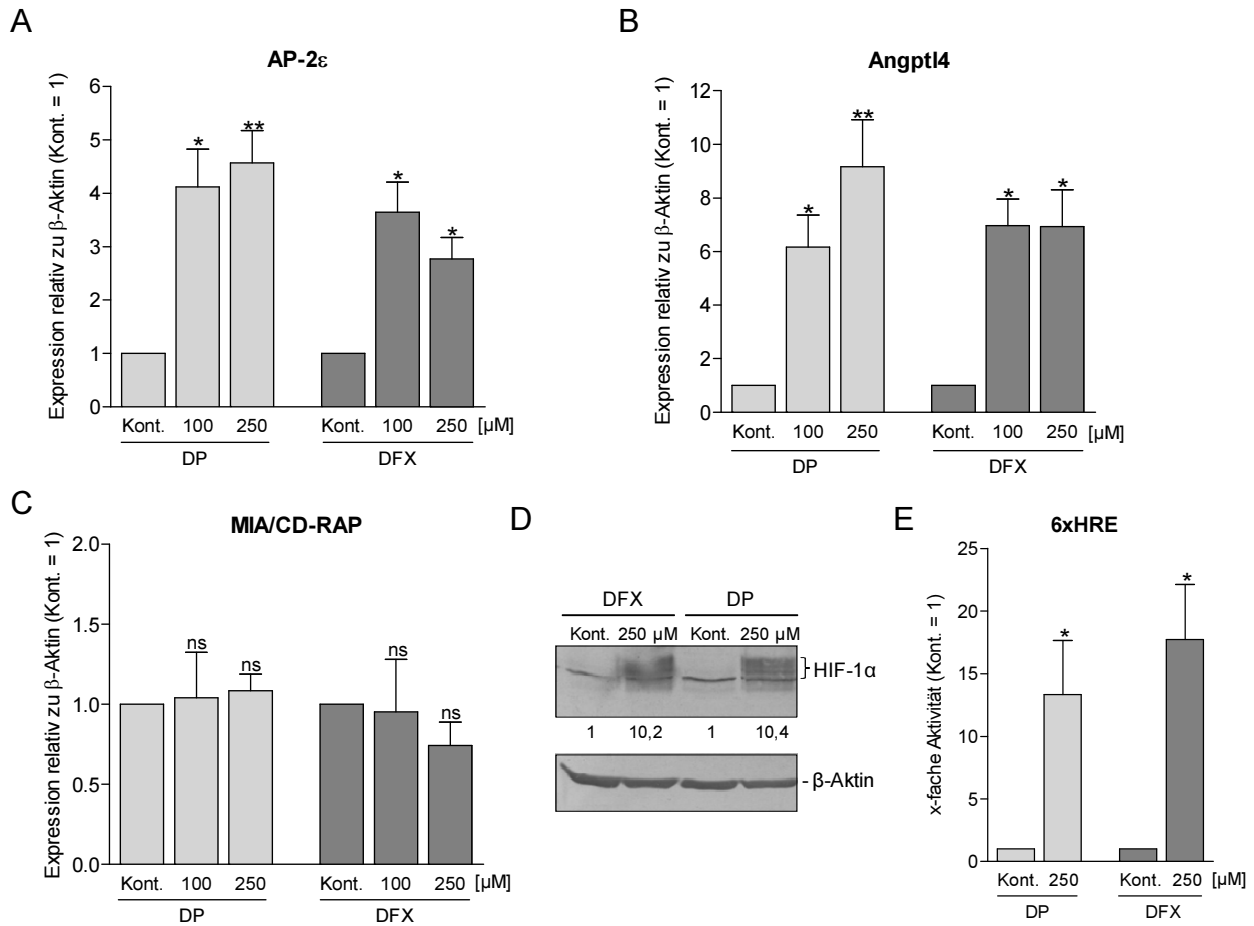
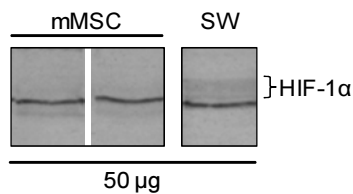


Abb. 2.18: Induktion der AP-2 ϵ Expression nach DP bzw. DFX Behandlung

mMSC aus WT Tieren wurden für 24 h mit den Eisenchelatoren DP und DFX in einer Konzentration von 100 bzw. 250 μ M oder dem entsprechenden Lösungsmittel (Kont.) behandelt. Nach Inkubation mit DP/DFX konnte ein signifikanter Anstieg der AP-2 ϵ (A) und Angptl4 (B) Expression registriert werden. (C) Im Gegensatz dazu veränderte sich der Expressionsgrad von MIA/CD-RAP nicht. (D) Die Akkumulation von HIF-1 α infolge der Behandlungen wurde auf Protein-Ebene mittels Western Blot kontrolliert. Die Intensität der HIF-1 α spezifischen Bande wurde densitometrisch vermessen und ist durch relative Zahlen symbolisiert. (E) Um zusätzlich die gesteigerte transkriptionelle Aktivität von HIF-1 nachzuweisen, wurden Zellen parallel mit einem 6xHRE Reporterplasmid transfiziert und wie oben behandelt. 24 h später wurde die Luziferaseaktivität gemessen, welche durch DP bzw. DFX um das etwa 15-fache induziert wurde. (A/B/C: qRT-PCR; D: Western Blot; E: Luziferase Assay)

Abb. 2.19: HIF-1 α Proteinkonzentration in SW1353 und mMSC unter Normoxie



Die Proteinkonzentration von HIF-1 α in SW1353 Zellen und mMSC unter Normoxie (21 % O₂) wurde mittels Western Blot Analyse verglichen. Die obere, relativ breite Bande wurde in allen Versuchen wie erwartet reguliert und spiegelt somit HIF-1 α wider. SW1353 Zellen wiesen demzufolge eine deutlich höhere HIF-1 α Proteinkonzentration als mMSC auf. (Western Blot; die dargestellten Ausschnitte stammen alle von demselben Blot)

Unter Einsatz zweier siRNA-Spezies gegen HIF-1 α (4.6.6) konnte, im Vergleich zu unspezifischer Kontroll siRNA, jeweils eine deutliche Reduktion der HIF-1 α mRNA-Menge in den transfizierten Zellen detektiert werden (Abb. 2.20 A). Dies hatte eine signifikante Abnahme der AP-2 ϵ (Abb. 2.20 B) sowie ANGPTL4 (Abb. 2.20 C) mRNA-Konzentration zur Folge. Im Gegensatz dazu wurde die mRNA-Expression von MIA/CD-RAP durch die siRNA-Transfektion nicht differentiell reguliert (Abb. 2.20 D). Zur Kontrolle des Versuchs wurde wiederum die HIF-1 α Proteinkonzentration sowie die Aktivität des 6xHRE Reportergenkonstrukts in den Zellen bestimmt. Beide Parameter wurden durch die siRNA-Behandlung deutlich reduziert (Abb. 2.20 E und F).

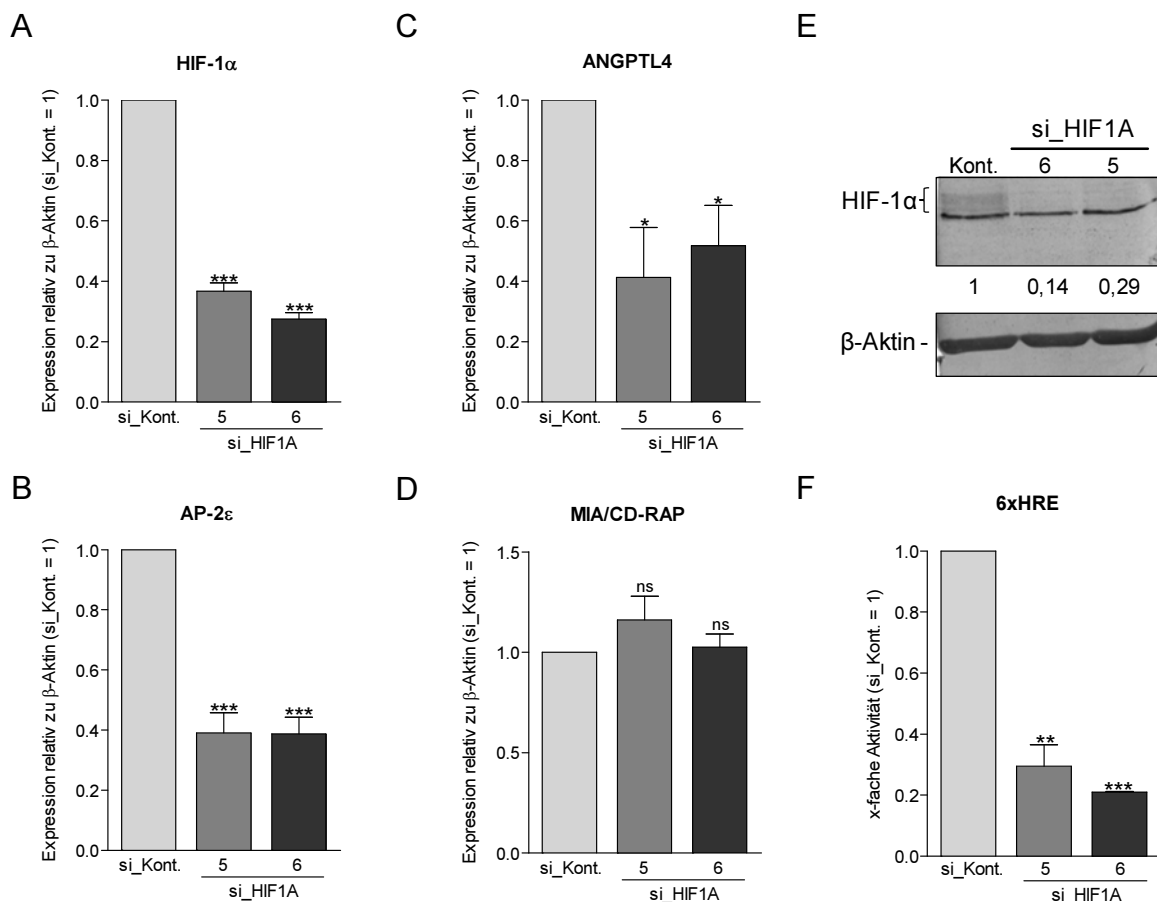


Abb. 2.20: Reduktion der AP-2 ϵ Expression durch siRNA gegen HIF-1 α

SW1353 Zellen wurden für 48 h mit siRNA gegen HIF-1 α (si_HIF1A_5 und _6) sowie unspezifischer Kontroll siRNA (si_Kont.) transfiziert. (A) Die erfolgreiche Reduktion der HIF-1 α mRNA-Konzentration wurde mittels qRT-PCR überprüft. Außerdem konnte nach der siRNA-Transfektion ein signifikanter Abfall der AP-2 ϵ (B) und ANGPTL4 (C) mRNA-Menge registriert werden, während die Expression von MIA/CD-RAP (D) nicht beeinflusst wurde. (E) Die Reduktion von HIF-1 α nach siRNA-Behandlung wurde auf Protein-Ebene mittels Western Blot verifiziert. Die Intensität der HIF-1 α spezifischen Bande wurde densitometrisch vermessen und ist durch relative Zahlen symbolisiert. (F) Parallel wurde die Aktivität des 6xHRE Reporterplasmids in den Zellen analysiert, welche bei Kotsinfektion von siRNA gegen HIF-1 α deutlich abnahm. (A/B/C/D: qRT-PCR; E: Western Blot; F: Luziferase Assay)

Dass die Expression von AP-2 ϵ tatsächlich durch Hypoxie reguliert wird, konnte abschließend durch eine 24-stündige Inkubation von mMSC bei 1 % atmosphärischer Sauerstoffkonzentration nachgewiesen werden. Im Vergleich zu Kontrollansätzen unter Normoxie (21 % O₂) wurde durch den Sauerstoffmangel eine deutliche Steigerung der mRNA-Konzentration von AP-2 ϵ als auch von Angptl4 hervorgerufen (Abb. 2.21 A und B), während die Expression von MIA/CD-RAP bei diesen Versuchen erstaunlicherweise sogar zurückging (Abb. 2.21 C). Die intrazelluläre Akkumulation von HIF-1 α unter Sauerstoffmangel konnte mittels Western Blot bestätigt werden (Abb. 2.21 D).

Zusammengefasst konnte in diesem Abschnitt durch verschiedene *in vitro* Experimente nachgewiesen werden, dass die Expression von AP-2 ϵ in humanen und murinen Zellen durch hypoxische Bedingungen über HIF-1 reguliert wird. Zusätzlich deutet das Expressionsmuster des Hypoxiemarkers Angptl4 darauf hin, dass die Sauerstoffversorgung des Knorpelgewebes im Laufe des Wachstums der Extremitäten abnimmt, was für die hohe AP-2 ϵ Expression im *Femur*-Epiphysenknorpel aus neugeborenen Mäusen verantwortlich zu sein scheint. Diese Daten wurden zur Veröffentlichung eingereicht.

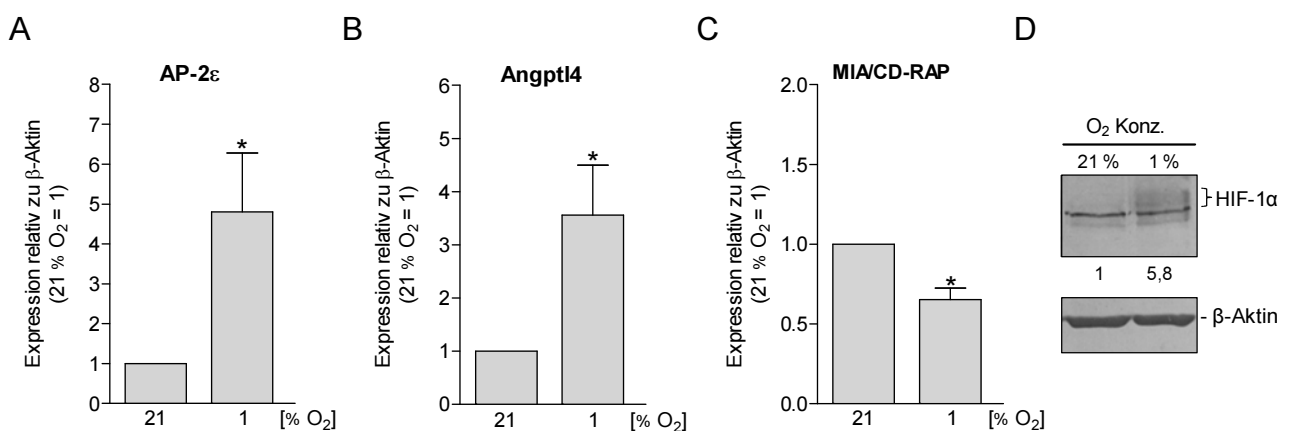


Abb. 2.21: Regulation der AP-2 ϵ Expression durch Hypoxie

mMSC wurden für 24 h bei 21 % bzw. 1 % atmosphärischer Sauerstoffkonzentration inkubiert. Im Vergleich zu Zellen bei Normoxie konnte infolge des Sauerstoffmangels ein signifikanter Anstieg der AP-2 ϵ (**A**) und Angptl4 (**B**) Expression registriert werden. (**C**) Im Gegensatz dazu kam es sogar zu einer Reduktion der MIA/CD-RAP Transkriptionsrate. (**D**) Die Anhäufung von HIF-1 α nach Inkubation bei 1 % O₂ wurde auf Protein-Ebene mittels WB verifiziert. Die Intensität der HIF-1 α spezifischen Bande wurde densitometrisch vermessen und ist durch relative Zahlen symbolisiert. (A/B/C: qRT-PCR; D: Western Blot)

2.4 Verstärkte OA-Progression in *Tfap2e* knockout Mäusen

Aufgrund der vergleichsweise hohen Expression von AP-2 ϵ im Epiphysenknorpel aus neugeborenen Mäusen sollte nun eine mögliche funktionelle Rolle des Transkriptionsfaktors im postembryonalen Knorpelgewebe aufgedeckt werden. Da neugeborene Tiere nicht für Tierversuche einsetzbar sind, wurde der AP-2 ϵ Expressionsstatus zusätzlich im artikulären Knorpelüberzug aus den Kniegelenken von adulten Tieren im Alter von ca. 10 Wochen analysiert. Bei den WT Tieren war auch hier AP-2 ϵ auf mRNA-Ebene spezifisch nachweisbar (vgl. Abb. 4.1 unter 4.3.2), und die Expression gegenüber den neugeborenen Mäusen sogar noch einmal um einen Faktor von etwa acht erhöht (nicht gezeigt). Deshalb wurde im Folgenden mit adulten Mäusen weitergearbeitet.

Trotz der nicht vorhandenen Expression von AP-2 ϵ fielen bei *Tfap2e* $-/-$ Mäusen im Alter von ca. 10 Wochen bei der histologischen Begutachtung des Gelenkknorpels keine morphologischen Unterschiede zu WT Mäusen auf (Abb. 2.22 A). Auch im Rahmen der ultrastrukturellen Analyse der Knorpelzellen und der extrazellulären Matrix waren keine offensichtlichen Unterschiede greifbar (Abb. 2.22 B).

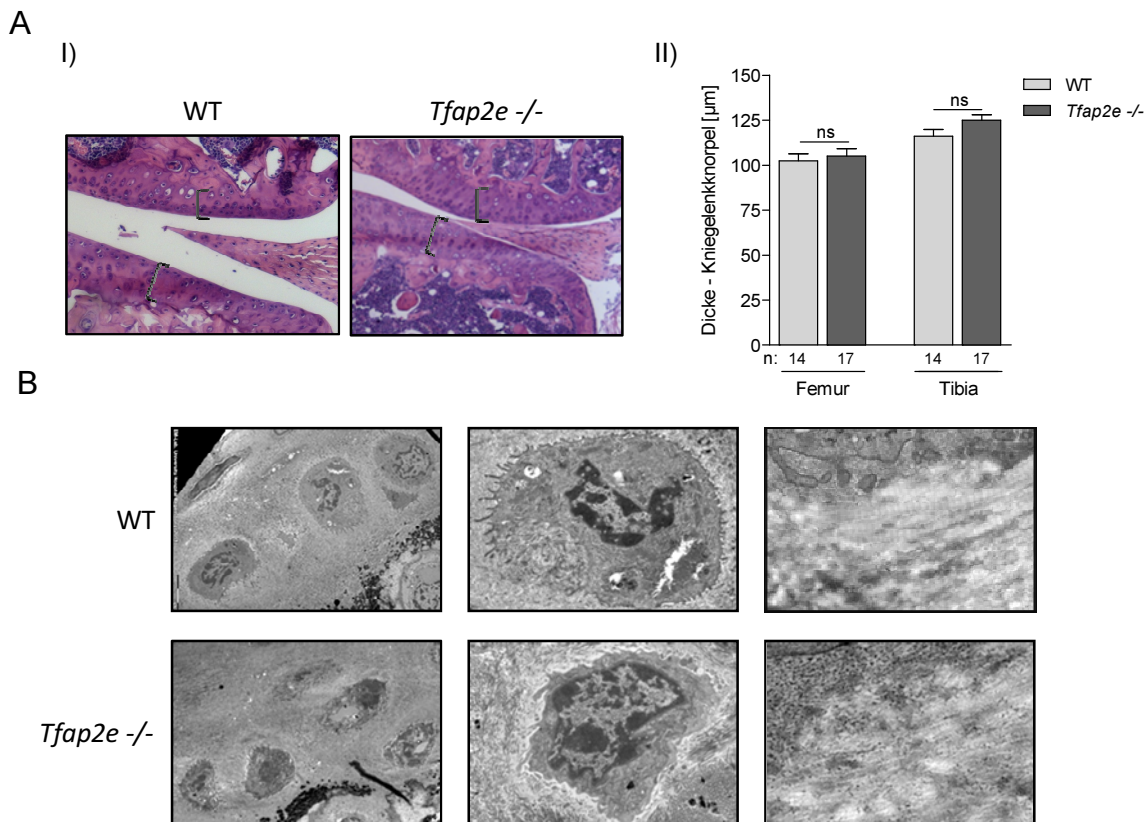


Abb. 2.22: Histologischer und ultrastruktureller Vergleich des Kniegelenkknorpels von *Tfap2e* $-/-$ und WT Mäusen

(A) Histologische Schnitte von Kniegelenken aus WT und *Tfap2e*^{-/-} Mäusen im Alter von ca. 10 Wochen (I). Es konnten in diesem Alter keine offensichtlichen Unterschiede in der Morphologie des artikulären Knorpels beobachtet werden. Zusätzlich wurde die Dicke des artikulären Knorpelüberzugs von *Femur* und *Tibia* vermessen (schwarze Klammern zeigen die Vermessungspunkte), wobei diese bei beiden Genotypen jeweils ungefähr gleich groß war (II). (B) Exemplarische Aufnahmen zur ultrastrukturellen Analyse des Kniegelenkknorpels von je 2 adulten WT bzw. *Tfap2e*^{-/-} Mäusen (Links/Mitte: Chondrozyten. Rechts: Extrazelluläre Matrix). Die Bilder wurden von Prof. Dr. E. Hunziker (Orthopädische Chirurgie, Uniklinikum Bern, Schweiz) begutachtet. Dabei wurden keine offensichtlichen Differenzen deutlich. (A: HE-Färbung, die n-Zahlen spiegeln einzelne Tiere wider; B: Transmissions-Elektronenmikroskopie)

Es ist jedoch bekannt, dass phänotypische Veränderungen bestimmter *knockout* Spezies nur unter Stress bzw. pathophysiologischen Bedingungen auftreten, aber im Normalzustand nicht offensichtlich sind (Stanton *et al.*, 2005; Little *et al.*, 2009; Schmid *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013). Deshalb wurden Tiere beider Genotypen einem *in vivo* Modell zur Induktion einer Osteoarthritis (OA) unterzogen (5.6.8). Für den Versuch wurde bei WT und *Tfap2e* *knockout* Mäusen jeweils am rechten Hinterlauf der mediale Meniskus vom *Tibia*-Plateau abgehoben und das Kniegelenk so destabilisiert (DMM, engl. *destabilization of the medial meniscus*). Aufgrund dieser Prozedur kommt es in der Folgezeit zu einer Überbelastung und somit Schädigung der artikulären Knorpeloberflächen, die mit einer progressiven Osteoarthritis vergleichbar ist (Kawamura *et al.*, 2003; Schmid *et al.*, 2010). Das linke Bein diente jeweils als Kontrolle (Sham), wobei die Kniekapsel zwar eröffnet, aber keine Destabilisierung des Gelenks durchgeführt wurde.

In einer früheren Studie mit der MIA/CD-RAP defizienten Maus konnten in WT Tieren bei identischer experimenteller Vorgehensweise nach 10 Tagen leichtgradige und nach 3 Wochen mittelgradige Anzeichen für eine Osteoarthritis im Gelenkknorpel festgestellt werden (Schmid *et al.*, 2010). Deshalb wurden in dieser Arbeit ähnliche Zeitpunkte (10 und 17 d) gewählt, wobei für die WT Mäuse vergleichbare Ergebnisse erzielt werden konnten (Abb. 2.23 A).

Bei den *Tfap2e*^{-/-} Mäusen war anfangs (10 d) ebenfalls nur ein sehr geringes Maß an Schädigung im artikulären Knorpel feststellbar (Abb. 2.23 A). Überraschenderweise konnte bei den Tieren jedoch 17 Tage nach der OP eine signifikant verstärkte Manifestation der Erkrankung im Vergleich zu WT Tieren detektiert werden (Abb. 2.23 A). Zur Bewertung der Osteoarthritis wurden die Schäden im artikulären Knorpel auf histologischer Ebene nach dem Bewertungssystem von Pritzker und Kollegen von Herrn Dr. T. Schubert (Institut für angewandte Pathologie, Speyer) qualitativ und quantitativ bestimmt (Pritzker *et al.*, 2006). Diese äußerten sich an Tag 17 in Form von deutlichen Läsionen, Furchen und Regionen mit inhomogener Hämatoxylin/Eosin(HE)-Färbung (Abb. 2.23 B). Demgegenüber wiesen die Sham-Gelenke eine glatte Oberfläche ohne pathologische Veränderungen auf (Abb. 2.23 B).

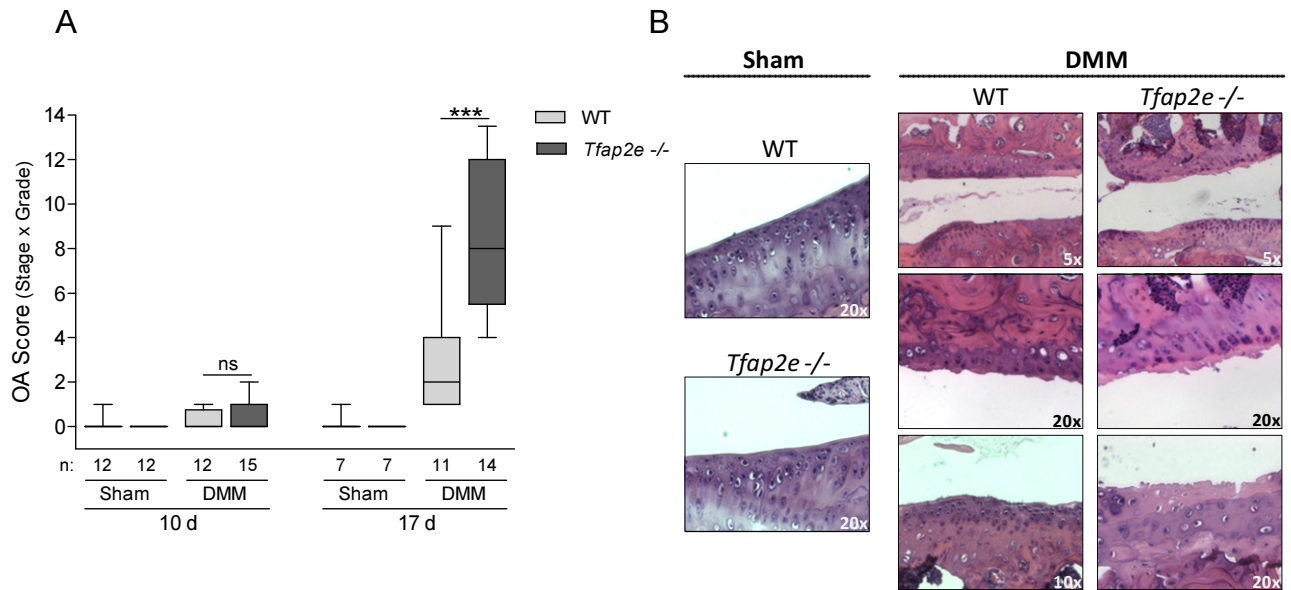


Abb. 2.23: Verstärkte Progression einer induzierten Osteoarthritis (OA) in *Tfap2e*^{-/-} Mäusen

In 6 bis 8 Wochen alten WT und *Tfap2e* knockout Mäusen wurde jeweils im rechten Kniegelenk durch Destabilisation des medialen Meniskus (DMM) eine Osteoarthritis induziert. Am linken Hinterlauf wurde eine entsprechende Kontroll-Operation (Sham) durchgeführt. Nach Beendigung des Versuchs wurden die Kniegelenke zur Herstellung histologischer Schnitte und anschließender HE-Färbung weiter prozessiert. **(A)** Die Progression der OA wurde von Herrn Dr. T. Schubert (Institut für angewandte Pathologie, Speyer) analysiert (OA Score = Grade x Stage). 10 Tage nach dem Eingriff konnte in den DMM Gelenken bei allen Mäusen nur ein geringer OA Score ermittelt werden, wohingegen nach 17 Tagen eine deutliche Manifestation der Erkrankung in den behandelten Gelenken sichtbar war. Die Ausprägung der OA bei *Tfap2e*^{-/-} Mäusen war an Tag 17 signifikant verstärkt. **(B)** 17 Tage nach dem Eingriff erschien der artikuläre Knorpel aus den Sham-Gelenken normal, ohne Hinweise für eine Schädigung. Demgegenüber zeigten sich bei den DMM-Gelenken klare Anzeichen für eine progressive Osteoarthritis. (A: OA Scoring, die n-Zahlen spiegeln einzelne Tiere wider; B: HE-Färbung)

Als nächstes stellte sich die Frage, welcher molekulare Mechanismus der verstärkten Knorpelschädigung in den *Tfap2e* knockout Mäusen zu Grunde liegt.

Da bei anderen AP-2 knockout Mausmodellen bereits eine erhöhte Apoptoserate in bestimmten Geweben und Organen beschrieben wurde (Schorle *et al.*, 1996; Moser *et al.*, 1997b; Hesse *et al.*, 2011) und Chondrozyten-Apoptose mit der Progression einer Osteoarthritis assoziiert ist (Matsuo *et al.*, 2001; Sharif *et al.*, 2004), wurde dies auch hier untersucht. Hierfür wurden immunhistochemische Färbungen gegen den Apoptosemarker *Cleaved Caspase 3* in den DMM-Gelenken durchgeführt (Matsuo *et al.*, 2001; Sharif *et al.*, 2004). Dabei konnten im artikulären Knorpelgewebe von WT als auch *Tfap2e*^{-/-} Mäusen an Tag 17 vereinzelt positiv gefärbte Zellen beobachtet werden (Abb. 2.24 oben). Allerdings gab es zwischen den beiden Genotypen keine deutlichen Abweichungen in deren Anzahl (nicht gezeigt). An Tag 10 waren keine gefärbten Zellen im Gelenknorpel detektierbar. Als Positivkontrolle der Immunhistochemie

fungierten Zellen in den Wachstumsfugen am Übergangsbereich von hypertrophen Chondrozyten zu Knochengewebe (Abb. 2.24 unten) (Gibson, 1998; Adams und Shapiro, 2002).

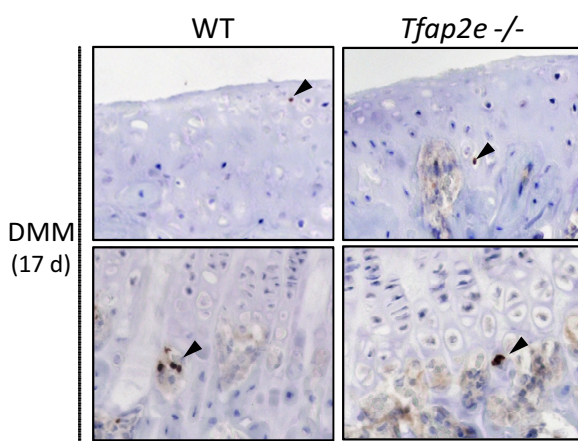


Abb. 2.24: Immunhistochemische Färbung von *Cleaved Caspase 3* nach OA-Induktion

17 Tage nach Destabilisation des medialen Meniskus (DMM) wurden Gewebeschnitte der entsprechenden Kniegelenke gegen den Apoptosemarker *Cleaved Caspase 3* immunhistochemisch gefärbt. Dabei ließen sich bei WT und *Tfap2e* $-/-$ Mäusen vereinzelt positiv gefärbte Zellen im artikulären Knorpelgewebe detektieren (oben). Ein klarer Unterschied in deren Anzahl konnte nicht festgestellt werden. Daneben waren auch am unteren Ende der Wachstumsfugen gefärbte Zellen zu finden (unten). (*Cleaved Caspase 3* Immunhistochemie, pro Genotyp wurden je 3 Tiere analysiert)

Da Apoptose somit als Grundlage für den anormalen Verlauf der OA in den AP-2 ϵ defizienten Mäusen auszuschließen war, wurde das OA-Modell wiederholt, aber diesmal die Kniegelenke nicht für Schnitte, sondern zur Isolation von RNA aus dem artikulären Knorpel von *Tibia* und *Femur* verwendet. So konnte die Expression einer größeren Anzahl von Genen, die für die verstärkte Manifestation der Erkrankung in den *Tfap2e* *knockout* Mäusen verantwortlich sein könnten, via qRT-PCR analysiert werden. Hier wurde zunächst die Expression von drei Matrix-Metalloproteinasen analysiert: *Mmp1*, *Mmp3* und *Mmp13*.

Von diesen Enzymen ist bekannt, dass sie die Progression einer OA fördern und häufig, wenn auch nicht immer, in Knorpelgewebe aus OA-Patienten verstärkt exprimiert werden (Shlopov *et al.*, 1997; Cawston und Wilson, 2006; Goldring und Goldring, 2007). Im Gegensatz zum Menschen existieren in der Maus zwei hoch-konservierte Gen-Varianten für die interstitielle Kollagenase *Mmp1* (*Mmp1a* und *Mmp1b*), deren mRNA-Transkripte in den murinen Proben jedoch auch nach OA-Induktion nicht nachweisbar waren (nicht gezeigt).

Demgegenüber waren *Mmp3* und *Mmp13* im murinen Gelenkknorpel beider Genotypen eindeutig exprimiert. Bezüglich *Mmp3* konnte in den DMM-Gelenken im Vergleich zu den Sham-Kontrollen an beiden Zeitpunkten jeweils nur eine geringe Steigerung der Expression detektiert werden (Abb. 2.25 A I und II). Andererseits wurde aber für *Mmp13* eine signifikante Zunahme der mRNA-Expression in den DMM-Gelenken der WT und *Tfap2e* $-/-$ Tiere an Tag 17 nach Induktion der OA festgestellt (Abb. 2.25 B II). Tendenziell war dies auch bereits 10 Tage nach der Operation zu beobachten (Abb. 2.25 B I).

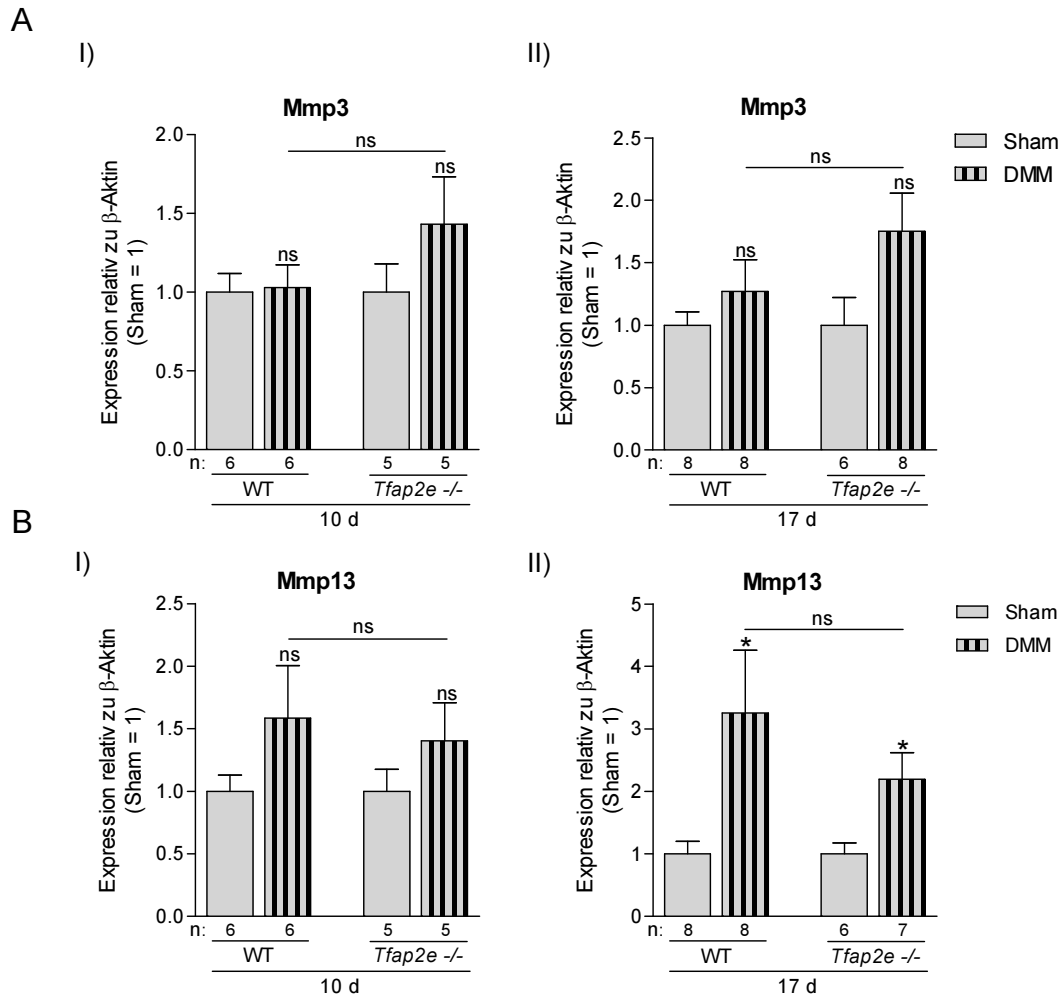


Abb. 2.25: Analyse der Mmp3 und Mmp13 mRNA-Expression im Verlauf des OA-Modells

In 6 bis 8 Wochen alten WT und *Tfp2e*^{-/-} Mäusen wurde wie unter Abb. 2.23 beschrieben eine OA durch Destabilisation des medialen Meniskus (DMM) induziert. 10 bzw. 17 Tage später wurde der artikuläre Knorpel aus den Kniegelenken zur Isolierung von gesamtzellulärer RNA präpariert. Anschließend wurde die Expression der Matrix-Metalloproteinasen Mmp3 (**A**) und Mmp13 (**B**) in den DMM-Gelenken bestimmt und in Relation zu den entsprechenden Kontrollgelenken (Sham) gesetzt. Mmp3 war in den DMM-Gelenken jeweils nur leicht verstärkt exprimiert (A I und II). Demgegenüber war bei Mmp13 an Tag 17 eine signifikante Steigerung der Expression in den behandelten Gelenken zu beobachten (B II), was sich auch schon an Tag 10 tendenziell andeutete (B I). Dies konnte in WT und *Tfp2e*^{-/-} Mäusen beobachtet werden. (qRT-PCR, die n-Zahlen spiegeln einzelne Tiere wider)

Separat ist aber anzumerken, dass der Grad der Induktion der Mmp13 Expression in den behandelten Gelenken im Vergleich zu den Kontrollen zwischen den beiden Genotypen nicht signifikant voneinander abwich (Abb. 2.25 B I und II). Tendenziell war der Induktionsgrad von Mmp13 in den *Tfp2e*^{-/-} Mäusen sogar niedriger als beim WT und konnte somit nicht für die verstärkte Progression der Erkrankung in den AP-2ε defizienten Tieren verantwortlich sein.

2.5 Erhöhte Grundexpression und -aktivität von Mmp13 im Knorpel der *Tfap2e* ^{-/-} Mäuse

Im Zuge der weiteren Analyse wurde neben dem Induktionsgrad in den DMM-Gelenken auch die Grundexpression von Mmp3 und Mmp13 in den Sham-Gelenken der WT Tiere und den Sham-Gelenken der *Tfap2e* ^{-/-} Mäuse gegenübergestellt. Dabei konnte eine überraschende Beobachtung gemacht werden: Die basale, physiologische Expression von Mmp13 war im artikulären Knorpel der AP-2 ϵ defizienten Mäuse im Vergleich zum WT um den Faktor 3 erhöht (Abb. 2.26 A). Bei Mmp3 war dies nicht der Fall. Um einen potentiellen systemischen Einfluss der im gegenüberliegenden Bein induzierten OA auszuschließen, wurde die Expression der beiden Kollagenasen zusätzlich in Gelenkknorpel aus komplett unbehandelten Mäusen gleichen Alters bestimmt. Dabei ergab sich ein ähnliches Bild wie in den Sham-Gelenken: Mmp13 war in den *Tfap2e* ^{-/-} Tieren signifikant überexprimiert, Mmp3 nicht (Abb. 2.26 B).

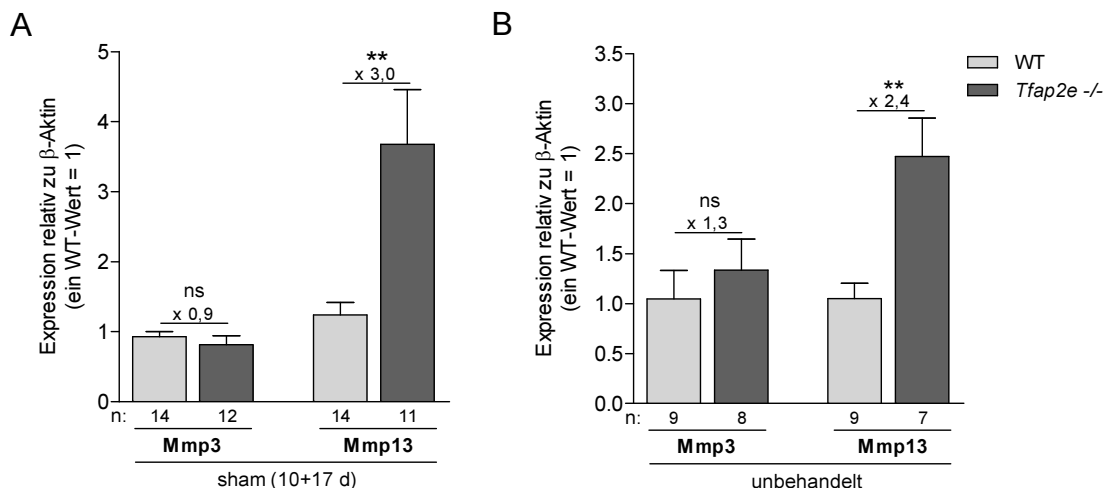


Abb. 2.26: Erhöhte Mmp13 Grundexpression im artikulären Knorpel der *Tfap2e* ^{-/-} Mäuse

(A) Die mRNA-Expression von Mmp3 und Mmp13 wurde im artikulären Knorpel aus den Sham-Gelenken der Mäuse aus dem OA-Modell (vgl. Abb. 2.25) bestimmt. Da es sich jeweils um die Kontrollen ohne Beeinträchtigung des Meniskus handelte, wurden beide Zeitpunkte (Tag 10 und Tag 17) zusammengefasst und anschließend WT und *Tfap2e* ^{-/-} miteinander verglichen. Dabei konnte für Mmp13 eine signifikant erhöhte Grundexpression in den AP-2 ϵ defizienten Tieren festgestellt werden. **(B)** Zusätzlich wurde die Expression der beiden Matrix-Metalloproteinasen im artikulären Knorpel vollkommen unbehandelter Mäuse (10 w) analysiert. Auch hier ließ sich im Gegensatz zu Mmp3 eine signifikant erhöhte Mmp13 Expression nachweisen. (qRT-PCR, die n-Zahlen spiegeln einzelne Tiere wider)

Infolge wurde die Expression der Gene für die Zytokine Tumornekrosefaktor (Tnf) und Interleukin-1 beta (Il1b), von denen bekannt ist, dass sie wichtige Mediatoren kataboler Prozesse in Chondrozyten sind, im Gelenkknorpel der unbehandelten WT und *Tfap2e* ^{knockout} Mäuse untersucht (Goldring und Goldring, 2007). Daneben wurde die Expression von

Typ 10 Kollagen (Col10a1), das überwiegend zusammen mit Mmp13 in späten hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird, analysiert (Castagnola *et al.*, 1986; Linsenmayer *et al.*, 1988; Reichenberger *et al.*, 1991). Eine differentielle Regulation würde Rückschlüsse auf ein anormales Differenzierungsverhalten der artikulären Knorpelzellen in *Tfap2e* ^{-/-} Tieren zulassen. Bezüglich der Expression dieser 3 Gene ließen sich jedoch keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen detektieren (Abb. 2.27 A). Selbiges war auch bezüglich der mRNA-Expression für die Mmp-inhibierenden Faktoren Timp1, -2 und -3 (*tissue inhibitor of metalloproteinase*) der Fall (Abb. 2.27 B). Soweit konnte also nur für *Mmp13* eine Fehlregulation im Gelenkknorpel der AP-2 ϵ defizienten Tiere festgestellt werden. Zusätzlich wurde die Expression von AP-2 ϵ im Knorpel aus den DMM-Gelenken und den unbehandelten Gelenken bestimmt, wobei es nach Induktion der OA analog zum Menschen zu einer signifikanten Zunahme der Expression des Transkriptionsfaktors kam (Abb. 2.28).

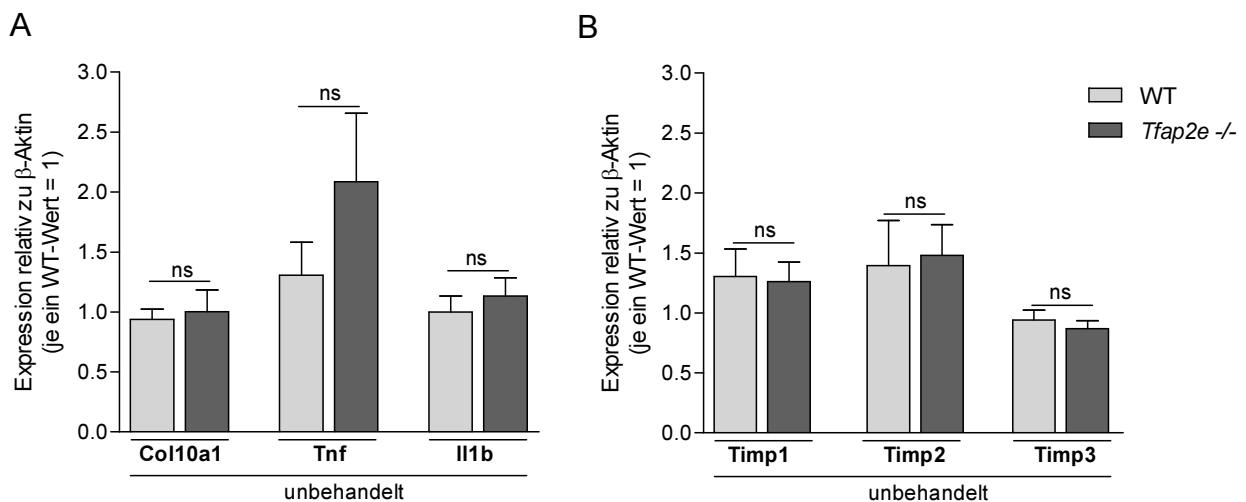


Abb. 2.27: Expressionsvergleich weiterer OA-relevanter Gene in WT und *Tfap2e* ^{-/-} Mäusen

(A) Die Expression von Col10a1, Tnf und Il1b wurde im artikulären Knorpel aus den unbehandelten WT und *Tfap2e* ^{-/-} Mäusen (vgl. Abb. 2.26 B) auf mRNA-Ebene bestimmt und in Relation gesetzt. Dabei wurden keine signifikanten Abweichungen festgestellt. (B) Ebenso gab es bezüglich der Expression von Timp1-3 keine signifikanten Differenzen. (A/B: qRT-PCR)

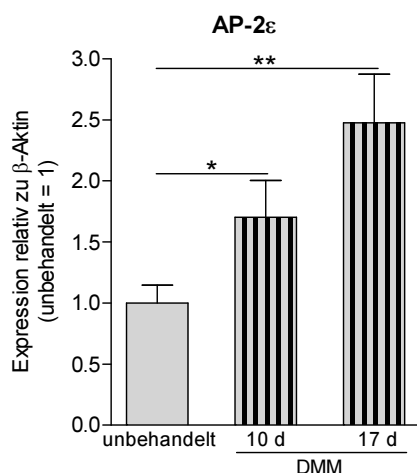


Abb. 2.28: Erhöhte AP-2 ϵ Expression im artikulären Knorpel der Mäuse aus dem OA Modell

Die mRNA-Expression von AP-2 ϵ im artikulären Knorpel der WT Mäuse wurde in unbehandelten Gelenken sowie 10 bzw. 17 Tage nach Induktion der OA (DMM) bestimmt und in Relation gesetzt. Es konnte eine signifikant verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors in den DMM-Gelenken detektiert werden. (qRT-PCR)

Dass es aufgrund der zuvor festgestellten Mmp13-Dysregulation zu einer funktionell stärkeren katabolen Grundaktivität im artikulären Knorpel der *Tfap2e* knockout Mäuse kommt, wurde über *in vitro* Kultivierung von Knorpel explantaten verifiziert. Anstelle von Knorpel aus dem Kniegelenk wurde hierfür der artikuläre Knorpelüberzug des *Femur*-Kopfes verwendet, da sich dieser deutlich leichter und weitestgehend ohne mechanische Schädigung des Gewebes vom subchondralen Knochen abtrennen lässt und sich deshalb besser für eine weitere Kultivierung eignet. Pro Tier wurden je zwei Hüftknorpel explantate isoliert, deren Gewicht bestimmt und über insgesamt 5 Tage *in vitro* kultiviert. Teilweise wurde zusätzlich ein spezifischer Mmp13 Inhibitor (5.6.7) hinzugefügt. Im Anschluss an die Kultivierung wurde die Mmp13 Aktivität in den Überständen mittels eines Fluoreszenz-basierten Assays bestimmt (5.4.4).

Übereinstimmend mit den vorherigen mRNA-Expressionsdaten war diese bei den *Tfap2e* $-/-$ Mäusen im Vergleich zu den WT Tieren signifikant erhöht (Abb. 2.29 A). Nach Zugabe des Mmp13 Inhibitors kam es bei den WT Explantaten zu einer leichten und bei den *Tfap2e* $-/-$ Explantaten zu einer signifikanten Reduktion der Mmp13 Aktivität (Abb. 2.29 A). Zusätzlich wurde zur Normalisierung die Mmp13 Aktivität im Überstand jeweils auf das zugehörige Gesamtgewicht (Abb. 2.29 B) bzw. den genomischen DNA-Gehalt (Abb. 2.29 C) der Knorpel explantate, Letzterer repräsentativ für die in den Fragmenten enthaltene Zellzahl, bezogen. Dabei ergaben sich praktisch die gleichen Resultate wie vor der Normalisierung.

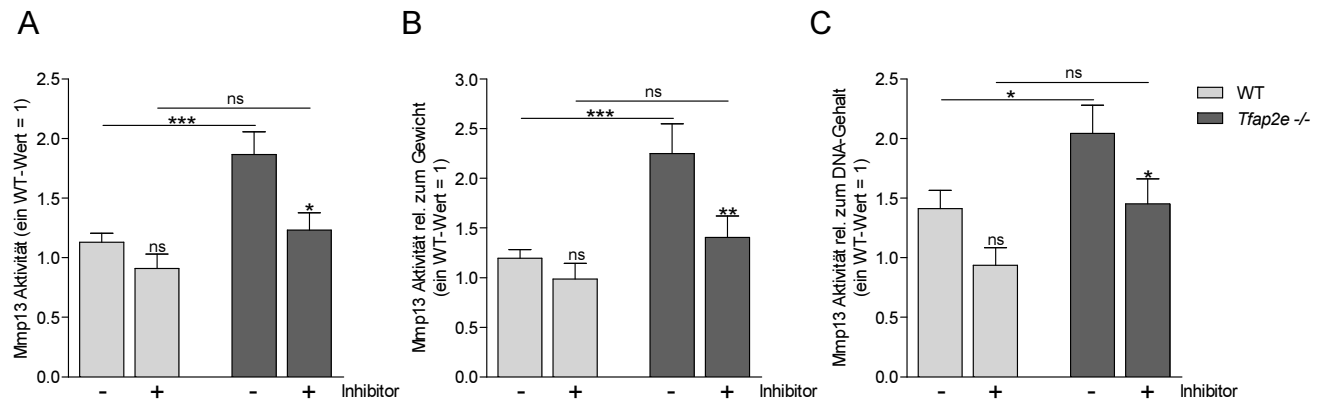


Abb. 2.29: Erhöhte Mmp13 Aktivität im Knorpel der *Tfap2e* $-/-$ Mäuse

Der artikuläre Knorpelüberzug des *Femur*-Kopfes von WT und *Tfap2e* $-/-$ Mäusen (2 pro Tier) wurde vom darunterliegenden Knochen abgetrennt und für 2 Tage in Medium mit fetalem Kälberserum *in vitro* kultiviert. Danach wurde und das Medium auf serum-frei umgestellt und zu einigen Wells ein spezifischer Mmp13 Inhibitor hinzugefügt. Nach weiteren 3 Tagen Inkubation wurde die Mmp13 Aktivität in den Überständen bestimmt. (A) Dabei wurde bei *Tfap2e* $-/-$ relativ zu WT Explantaten eine signifikant erhöhte Mmp13 Aktivität gemessen. Nach Inkubation mit dem Mmp13 Inhibitor kam es beim WT zu einer leichten und bei *Tfap2e* $-/-$ zu einer signifikanten Reduktion der Mmp13 Aktivität. (B/C) Die ermittelte Mmp13 Aktivität wurde auf das Gesamtgewicht (B) sowie den DNA-Gehalt (C) der zugehörigen Knorpelfragmente bezogen. Hierbei ergaben sich ähnliche Resultate wie in A. (A/B/C: Mmp13 Aktivitätsassay; pro Gruppe wurden mindestens 8 Explantate eingesetzt)

Neben seiner Aktivität als Kollagenase spaltet Mmp13 auch Proteoglykane, wie z.B. Aggrecan, welche neben Kollagen, einen Hauptbestandteil der chondrozytären ECM darstellen (Singer *et al.*, 1995; Fosang *et al.*, 1996; Mercuri *et al.*, 2000). Die Konzentration an dabei freiwerdenden Glykosaminoglykanen (GAG), welche normalerweise mit dem Aggrecan-Kernprotein verbunden sind, wurde als Maß für die Degradation der extrazellulären Matrix im Verlauf der Kultivierung bestimmt. Interessanterweise war die GAG-Konzentration im Medium mit Knorpelimplantaten aus *Tfap2e* knockout Mäusen im Vergleich zu den WT Tieren um einen Faktor von etwa 2,5 erhöht (Abb. 2.30 A). Nach Zugabe des Mmp13 Inhibitors konnte in den WT Mäusen eine Reduktion der GAG-Freisetzung um ca. 50 % und bei den AP-2ε defizienten Mäusen um ca. 65 % festgestellt werden. Durch den Inhibitor wurde der Unterschied in der Matrixdegradation zwischen den Genotypen weitestgehend aufgehoben (Abb. 2.30 A). Zur Normalisierung wurde die absolute GAG-Menge im Überstand erneut jeweils auf das zugehörige Gesamtgewicht (Abb. 2.30 B) bzw. den genomischen DNA-Gehalt (Abb. 2.30 C) der Knorpelimplantate bezogen, wodurch die Ergebnisse aber nicht verändert wurden.

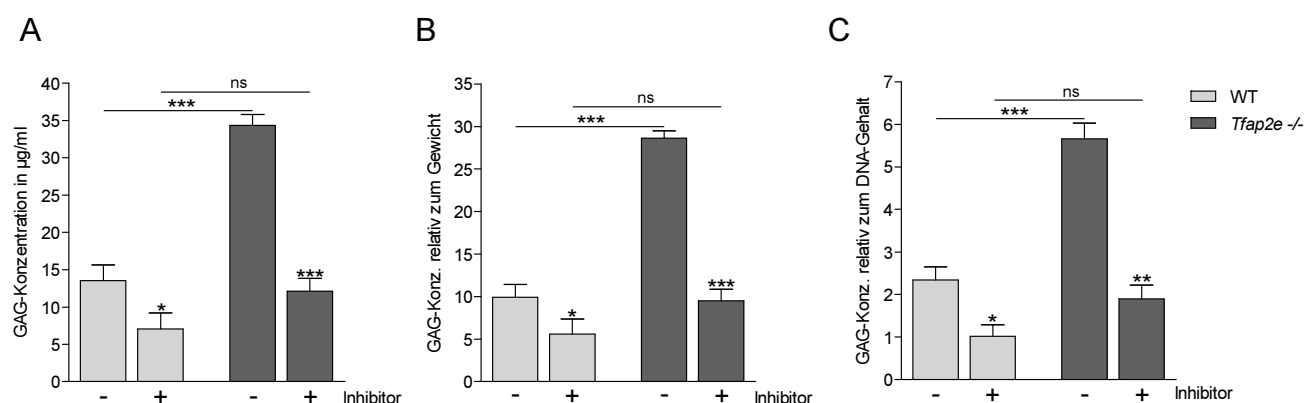


Abb. 2.30: Erhöhte Matrix Degradation im Knorpel der *Tfap2e*^{-/-} Mäuse

Der artikuläre Knorpelüberzug des *Femur*-Kopfes von WT und *Tfap2e*^{-/-} Mäusen wurde, wie unter Abb. 2.29 beschrieben, isoliert und kultiviert. Anschließend wurde die Glykosaminoglykan(GAG)-Freisetzung, in den Überständen bestimmt. (A) Dabei wurde bei *Tfap2e*^{-/-} relativ zu WT Explantaten eine signifikant erhöhte GAG-Konzentration gemessen. Nach Inkubation mit dem Mmp13 Inhibitor kam es beim WT zu einer leichten und bei *Tfap2e*^{-/-} zu einer signifikanten Reduktion der GAG-Freisetzung. (B/C) Die absolute GAG-Konzentration wurde auf das Gesamtgewicht (B) sowie den DNA-Gehalt (C) der zugehörigen Knorpelfragmente bezogen. Hierbei ergaben sich ähnliche Resultate wie in A. (A/B/C: GAG-Release Assay; pro Gruppe wurden mindestens 8 Explantate eingesetzt)

Zusammenfassend konnte also eine deutlich erhöhte Grundexpression sowie Aktivität des katabolen Enzyms Mmp13 im artikulären Knorpel der AP-2ε defizienten Mäuse festgestellt werden. Dies scheint langfristig zu Veränderungen in der Beschaffenheit der Knorpelmatrix zu führen, welche sich zwar bei gesunden *Tfap2e*^{-/-} Tieren (im Alter von 10 Wochen) noch nicht

äußerten, aber unter pathophysiologischen Bedingungen wie einer OA offensichtlich wurden. Wahrscheinlich konnte der AP-2 ϵ defiziente Gelenkknorpel nicht in gleichem Maße auf die erhöhte Belastung reagieren wie WT Knorpel, so dass es in den *Tfap2e knockout* Mäusen zu einer verstärkten Progression der Erkrankung kam. Diese Ergebnisse wurden zur Veröffentlichung eingereicht.

3 Diskussion

Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe belegen die Expression von AP-2 ϵ in Knorpelzellen. Unter anderem wurde der Transkriptionsfaktor in humanen, artikulären Chondrozyten und in der Chondrosarkomzelllinie SW1353 nachgewiesen (Wenke *et al.*, 2006). In einer Folgestudie wurde AP-2 ϵ auch in humanen mesenchymalen Stammzellen detektiert, wobei die Expression nach Differenzierung der Zellen hin zu Chondrozyten deutlich anstieg (Wenke *et al.*, 2009). Im Zuge dieser Veröffentlichung konnte der Transkriptionsfaktor zudem während der murinen Embryonalentwicklung in hypertrophen Chondrozyten lokalisiert werden. Darüber hinaus war die Expression des Transkriptionsfaktors in Chondrozyten aus Osteoarthrose-Patienten im Vergleich zu gesunden Menschen erhöht (Wenke *et al.*, 2009).

Bis dato gibt es jedoch weder Informationen über die genaue Funktion von AP-2 ϵ in Chondrozyten noch, ob der Faktor die embryonale Skelettentwicklung bzw. die Pathogenese einer Osteoarthrose beeinflusst. Gegenstand dieser Arbeit war es daher, diese Aspekte näher zu untersuchen. In diesem Kapitel werden nun die Ergebnisse dieser Dissertation unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur diskutiert.

3.1 CXCL1 und COL2A1 als Zielgene von AP-2 ϵ in Chondrozyten

Im Rahmen der ersten Veröffentlichung zur Expression von AP-2 ϵ in Knorpelzellen konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor mit bestimmten Regionen des *Integrin α 10* Promotors interagiert (Wenke *et al.*, 2006). Daraufhin wurde über einen GeneChip® Human Promoter 1.0R Array nach weiteren Genen in humanen Chondrozyten gesucht, an deren Promotorsequenz AP-2 ϵ bindet. Dabei wurde unter anderem das Gen *CXCL1* identifiziert. Die Expression von *CXCL1* in Chondrozyten konnte erstmals von Borzi und Kollegen gezeigt werden (Borzi *et al.*, 1999). Damit übereinstimmend konnte in unserer Arbeitsgruppe die entsprechende mRNA auch in der Chondrosarkomzelllinie SW1353 (4.4) nachgewiesen werden. Gleichzeitig kam es in den Zellen nach einer Überexpression von AP-2 ϵ zu einer Induktion der *CXCL1* Expression (Wenke *et al.*, 2011).

An dieser Stelle knüpfen die Ergebnisse dieser Arbeit an. Innerhalb der proximalen *CXCL1* Promotorsequenz wurden über eine *in silico* Analyse zunächst 3 putative AP-2 Bindemotive ausfindig gemacht. Die Ergebnisse aus Reportergen-Assays mit unterschiedlichen langen *CXCL1* Promotorkonstrukten legten nahe, dass das Motiv AP-2.2 (-144 bis -135 bp) für die Induktion der Promotoraktivität durch AP-2 ϵ verantwortlich ist. Demzufolge ließ sich die

CXCL1 Promotoraktivität nach Mutation von AP-2.2 nicht mehr durch Überexpression des Transkriptionsfaktors steigern. Interessanterweise kam es zudem zu einer signifikanten Reduktion der Grundaktivität des mutierten Konstrukts. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die verwendeten SW1353 Zellen natürlicherweise AP-2 ϵ exprimieren (Wenke *et al.*, 2006). Der beobachtete Abfall der Grundaktivität muss also auf der nicht länger möglichen Bindung von endogenem AP-2 ϵ beruhen. Schließlich wurde die direkte Interaktion zwischen AP-2 ϵ und dem Motiv AP-2.2 durch Gelshift Experimente und eine Chromatin-Immunpräzipitation verifiziert. In der Summe zeigen diese Ergebnisse, dass AP-2 ϵ ein positiver Regulator der *CXCL1* Promotoraktivität und Expression in humanen Chondrozyten ist, und *CXCL1* somit ein Zielgen von AP-2 ϵ darstellt.

Zur funktionellen Rolle von *CXCL1* in Knorpelzellen gibt es bisher nur wenige Studien. Merz und Kollegen konnten zeigen, dass das Chemokin die hypertrophe Differenzierung von Knorpelzellen *in vitro* über eine Aktivierung des p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) Signalwegs nach Bindung an CXCR2 (*CXC receptor 2*) fördert (Merz *et al.*, 2003). Dabei führte die Behandlung der Zellen mit rekombinantem *CXCL1* zu einer verstärkten Matrix-Kalzifizierung sowie COL10A1 und MMP13 Expression (Merz *et al.*, 2003). Interessanterweise kam es jedoch nicht zu einer tatsächlichen Zunahme der MMP13 Aktivität, was wahrscheinlich auf einer gleichzeitigen Induktion der TIMP3 Expression beruht (die Wirkungsweise dieser Proteingruppe wird unter 3.4 noch genauer erläutert).

Dies lässt vermuten, dass AP-2 ϵ die hypertrophe Differenzierung von Knorpelzellen im Zuge der enchondralen Ossifikation über Induktion der *CXCL1* Expression fördert. Dementsprechend wäre bei *Tfap2e* $-/-$ Mäusen ein verzögerter Eintritt in die Hypertrophie zu erwarten. Überraschenderweise war dies jedoch nicht zu beobachten (vgl. 3.2). Im Gegenteil, es gab sogar Anzeichen für eine erhöhte Col10a1 sowie Mmp13 Expression bei der *in vitro* Differenzierung von mesenchymalen Zellen aus den Extremitätenknospen AP-2 ϵ defizienter Embryonen (vgl. 3.2).

In einer weiteren Veröffentlichung konnte von Borzi und Kollegen eine erhöhte *CXCL1* Expression in OA-Chondrozyten im Vergleich zu Chondrozyten aus gesunden Menschen detektiert werden (Borzi *et al.*, 1999). Außerdem wurde von diesen Autoren *in vitro* eine Apoptose-induzierende Wirkung von *CXCL1* auf artikuläre Chondrozyten beschrieben, die jedoch von bestimmten Bedingungen, insbesondere der ECM-Zusammensetzung abhängig war. So wurden in OA-Knorpelimplantaten nur dann apoptotische Vorgänge induziert, wenn der Proteoglykan-Gehalt der Matrix relativ niedrig war (Borzi *et al.*, 2002). Umgekehrt konnte bei isolierten Chondrozyten dieser Effekt nur beobachtet werden, wenn die Zellen nach dem

Aussäen genug Zeit hatten, ihre ECM zu rekonstituieren (Borzi *et al.*, 2002). In einer Folgestudie wurde die schon von Merz und Kollegen beschriebene Hypertrophie-induzierende Wirkung von CXCL1 bestätigt und ebenfalls beobachtet, dass dafür, wie auch für die Induktion von Apoptose, eine Aktivierung des p38 MAPK Signalwegs erforderlich war (Olivotto *et al.*, 2007). Die Autoren stellten aber erneut fest, dass die Aktivierung des Signalwegs durch CXCL1, neben einem dreidimensionalen Kultursystem, vor allem von der Konzentration bestimmter Glykosaminoglykane in der Matrix abhängig war (Olivotto *et al.*, 2007). Beispielsweise wurden die CXCL1-abhängigen Effekte durch eine Vorinkubation der Zellen mit Chondroitin-4-Sulfat vollständig negiert (Olivotto *et al.*, 2007). In der Summe zeigen die Ergebnisse von Borzi bzw. Olivotto und Kollegen, dass die Wirkung von CXCL1 stark von spezifischen Rahmenbedingungen wie dem Differenzierungsstatus der Zellen und der Zusammensetzung der ECM abhängt. Dies offeriert eine mögliche Erklärung, warum die hypertrophe Differenzierung in den AP-2 ϵ defizienten Mäusen nicht wie erwartet verzögert eintrat.

Es bleibt jedoch festzuhalten, dass sowohl die Promotoraktivität als auch die Expressionsrate von *CXCL1* in humanen Chondrozyten *in vitro* eindeutig durch AP-2 ϵ reguliert wurde. Das Ergebnis aus der Chromatin-Immunpräzipitation legt nahe, dass dies auch *in vivo* der Fall ist. In wie weit dies die Differenzierung der Chondrozyten aber tatsächlich beeinflusst, bleibt an dieser Stelle offen. Dahingehend ist anzumerken, dass die von den anderen Autoren beschriebenen funktionellen Effekte von CXCL1 *in vivo* noch nicht bestätigt wurden.

Neben *CXCL1* konnte auch eine Interaktion zwischen AP-2 ϵ und dem proximalen Promotor von *COL2A1* festgestellt werden. Die dafür verantwortliche DNA-Region liegt etwa -130 bp vom Transkriptionsstart von *COL2A1* entfernt. Es ist bekannt, dass die Chondrozyten-spezifische Expression von murinem *Col2a1* stark von einem 182 bp umfassenden Enhancer in Intron 1 des Gens abhängt (Zhou *et al.*, 1995). Dieser Sequenzbereich alleine war ausreichend, um ein Transgen in Knorpelzellen zu exprimieren (Zhou *et al.*, 1995; Lefebvre *et al.*, 1996a). In nachfolgenden Studien konnten die dafür entscheidenden Nukleotide weiter eingegrenzt und so aufgedeckt werden, dass die Transkriptionsfaktoren L-Sox5, Sox6 und Sox9 mit der Enhancer-DNA interagieren und auf diese Weise die Expression des Gens induzieren (Lefebvre *et al.*, 1996a; Lefebvre *et al.*, 1996b; Lefebvre *et al.*, 1997; Lefebvre *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998). Weiterführende Studien mit dem humanen Ortholog ließen erkennen, dass die Regulation der COL2A1 Expression durch SOX9 von der intrazellulären Konzentration des Transkriptionsfaktors abhängig ist, SOX9 also biphasisch auf *COL2A1* wirkt (Kypriotou *et al.*, 2003).

Während eine niedrige Konzentration von SOX9 über den Intron 1 Enhancer zu einer Induktion der COL2A1 Expression führte, hatten hohe Konzentrationen einen gegenteiligen Effekt. Über entsprechende Deletionskonstrukte konnten Kypriotou und Kollegen nachweisen, dass dieser inhibitorische Effekt nicht durch den Enhancer, sondern durch den proximalen Promotor von *COL2A1*, genauer durch die ersten 266 bp im 5'-Bereich des Gens, vermittelt wird (Kypriotou *et al.*, 2003).

Unabhängig davon wurde von Ghayor und Kollegen eine Aktivierung des proximalen Promotors durch den Transkriptionsfaktor SP1 beobachtet, wobei der Effekt durch gleichzeitige Überexpression von SP3 aufgehoben wurde (Ghayor *et al.*, 2000). Zudem konnte nach Transfektion von primären Chondrozyten mit einem SP1 Expressionsplasmid ein deutlicher Anstieg der Kollagen Synthese festgestellt werden, bei SP3 war hingegen das Gegenteil der Fall (Ghayor *et al.*, 2000). Nachfolgend identifizierten Chadjichristos und Kollegen eine SP1 Bindestelle von -41 bis -33 bp relativ zum Transkriptionsstart und stellten fest, dass die bereits bekannte Inhibition der COL2A1 Expression durch IL-1 β ebenfalls über den proximalen Promotor vermittelt wird (Chadjichristos *et al.*, 2003). Die Behandlung von Chondrozyten mit IL-1 β resultierte dabei in einer Zunahme der SP3 sowie einer Abnahme der SP1 Proteinkonzentration (Chadjichristos *et al.*, 2003). Tan und Kollegen identifizieren 2 zusätzliche, überlappende SP1/EGR1 (*early growth response-1 transcription factor*) Bindemotive in der proximalen *COL2A1* Promotorsequenz (-119 bis -112 bp und -81 bis -74 bp). Nach Mutation der Bindestellen kam es zu einer deutlichen Reduktion der Promotoraktivität und nicht länger zu einer Reaktion auf IL-1 β (Tan *et al.*, 2003). Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass EGR-1 durch IL-1 β aktiviert wird und dann, ähnlich wie SP3, als Repressor der COL2A1 Expression wirkt, indem der Faktor mit SP1 um die beiden identifizierten Bindestellen konkurriert (Tan *et al.*, 2003). Insgesamt zeigen diese Daten, dass zwar die Enhancer-Region in Intron 1 für die Chondrozyten-spezifische Expression von *COL2A1* hauptverantwortlich ist, nichtsdestotrotz aber auch durch den proximalen Promotor eine Modulation der Typ II Kollagen Expression stattfinden kann.

In Bezug auf AP-2 ϵ wurde die Aktivität des verwendeten *COL2A1* Promotorkonstrukts (-577 bis +125) ab einer Kotransfektion von 50 ng AP-2 ϵ Expressionsplasmid deutlich reduziert. Letzteres führte in der verwendeten SW1353 Zelllinie zu einer etwa 8-fachen Steigerung der endogenen AP-2 ϵ Expression. Dass dieser relativ niedrige Grad an Überexpression bei AP-2 Faktoren bereits deutliche Effekte auf zelluläre Prozesse hat, zeigte sich bereits bei der *CXCL1* Analyse wie auch in vorherigen Studien (Wenke *et al.*, 2006). Weiterhin konnte die Inhibition des *COL2A1* Promotors nicht durch höhere Mengen an Expressionsplasmid gesteigert werden,

was eine rasche Sättigung des dafür verantwortlichen molekularen Prozesses impliziert. Um zu zeigen, dass die negative Regulation der Promotoraktivität mit einer Reduktion der tatsächlichen Transkriptionsrate des *COL2A1* Gens einhergeht, wurde die *COL2A1* mRNA Expression analysiert. Unerwarteterweise konnte nach 24 Stunden aber keine signifikante Abnahme der *COL2A1* mRNA-Expression nach Überexpression von AP-2 ϵ in den Zellen beobachtet werden (nicht gezeigt). Für die mRNA-Transkripte der nah verwandten Gene *COL1A1* bzw. *COL1A2* wurde eine relativ hohe Halbwertszeit von etwa 9 Stunden bestimmt (Sandmeyer *et al.*, 1981; Hamalainen *et al.*, 1985; Johnson *et al.*, 2000). Für den Fall, dass die Halbwertszeit der *COL2A1* mRNA ähnlich hoch oder höher ist, wäre es durchaus möglich, dass sich die etwa 40 prozentige Reduktion der *COL2A1* Promotoraktivität erst nach längerer Zeit auf das tatsächliche *COL2A1* mRNA Level auswirkt. Umgekehrt aber resultierte der si_RNA vermittelte *knockdown* von endogenem AP-2 ϵ in einer Steigerung der Aktivität des Promotorkonstrukts und, noch entscheidender, der *COL2A1* mRNA Menge. Das si_RNA Experiment zeigt also, dass AP-2 ϵ die Transkriptionsrate von *COL2A1* definitiv beeinflusst. Bei diesem Ansatz bestand hier nicht das Problem einer potentiell hohen mRNA Stabilität, da es infolge der Behandlung zu einer Induktion der *COL2A1* Expression kam, die unmittelbar in einer verstärkten *COL2A1* mRNA Neusynthese resultierte.

Anschließend wurde die Spezifität der inhibitorischen Wirkung von AP-2 ϵ auf den proximalen *COL2A1* Promotor untersucht. Dazu wurde der Einfluss von AP-2 α und AP-2 β auf das verwendete Promotorkonstrukt analysiert. Von beiden ist bekannt, dass sie die Chondrogenese bzw. Skelettentwicklung regulieren (Schorle *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996; Moser *et al.*, 1997a; Zhao *et al.*, 2011). Beide Faktoren hatten jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität des verwendeten *COL2A1* Promotorkonstrukts. Huang und Kollegen konnten jedoch eine AP-2 α vermittelte Reduktion der Col2a1 Expression in ATDC5 Zellen nachweisen (Huang *et al.*, 2004). Die Ergebnisse aus dieser Arbeit legen nahe, dass die dafür verantwortliche DNA-Region außerhalb des hier analysierten Promotorbereichs liegen muss.

Nichtsdestotrotz wurde der inhibitorische Effekt von AP-2 ϵ durch gleichzeitige Kotransfektion von gleichen oder höheren Mengen an AP-2 α Expressionsplasmid unterdrückt. Da AP-2 Faktoren nur in dimerisierter Form aktiv sind (Williams und Tjian, 1991), ist es denkbar, dass die parallele Überexpression von AP-2 α zur Ausbildung einer Dimervariante führt, welche die Aktivität des *COL2A1* Promotors nicht maßgeblich beeinflusst. Hierbei ist am wahrscheinlichsten, dass AP-2 ϵ Homodimere für die Inhibition verantwortlich sind, deren Anteil bei gleichzeitiger Überexpression von AP-2 α aber deutlich zurückgeht.

Die *in silico* Analyse über die MatInspector Software offerierte innerhalb der *COL2A1* Promotorsequenz ein einzelnes AP-2 Bindemotiv (AP-2.1). Überraschenderweise war dieses jedoch nicht regulatorisch aktiv. Eine Literaturrecherche machte indes deutlich, dass AP-2 Faktoren auch mit anderen G/C-reichen Sequenzen interagieren können, welche vom klassischen Bindemotiv 5'-GCCN₃GGC-3' abweichen. Beispiele dafür sind die virale SV40 (*simian vacuolating virus* 40) Enhancer-Sequenz 5'-CCCCAGGC-3' sowie das Motiv 5'-GN₄GGG-3' im humanen *MTIIA* (*metallothionein-2a*) Gen (Imagawa *et al.*, 1987; Mitchell *et al.*, 1987). Da der proximale *COL2A1* Promotor insgesamt einen sehr hohen G/C Anteil aufweist, wurde die Sequenz noch einmal nach Motiven durchsucht, welche zwar das typische GCC-GGC Palindrom aufweisen, jedoch 3±1 intermediäre Nukleotide enthalten. In der Sequenz konnten 2 entsprechende Motive lokalisiert werden (AP-2.2 / AP-2.3). Dabei war nur AP-2.3 speziesübergreifend konserviert, was eine regulatorische Funktion wahrscheinlicher machte.

Dies konnte über eine entsprechende Mutationsanalyse bestätigt werden: Nach der Mutagenese von AP-2.3 kam es nicht länger zu einer Inhibition der *COL2A1* Promotoraktivität durch AP-2ε. Widererwarten kam es darüber hinaus zu einer signifikanten Reduktion der Grundaktivität des Promotorkonstrukts. Diese beiden Beobachtungen führen zu folgenden Schlussfolgerungen: Zum einen scheint AP-2ε durch Interaktion mit der DNA an AP-2.3 die Reduktion der *COL2A1* Promotoraktivität zu vermitteln. Zum anderen müssen an dieser Stelle neben AP-2ε gleichzeitig aktivierende Transkriptionsfaktoren binden, was den Abfall der Grundaktivität nach der Mutagenese von AP-2.3 erklärt. Dementsprechend würde AP-2ε mit dem Aktivator um die Bindestelle konkurrieren, ähnlich wie für SP3 bzw. EGR1 und SP1 beobachtet (siehe oben). Dies würde auch erklären warum im EMSA mehrere, verschiedene Protein-DNA-Komplexe sichtbar waren. Dass AP-2ε speziell SP1 verdrängt, ist jedoch unwahrscheinlich, da die SP1 Motive nicht dem hier identifizierten Sequenzbereich AP-2.3 überlappen. Dass AP-2 Faktoren aber grundsätzlich die Expression eines Gens durch Kompetition um eine Bindestelle inhibieren können, wurde z.B. für die Gene *PTMA* (*prothymosin-α*) und *ODC* (*ornithine decarboxylase*) gezeigt (Gaubatz *et al.*, 1995). Dort konkurriert AP-2α mit c-myc um zwei überlappende Bindemotive und wirkt so negativ auf die Transkriptionsrate der Gene.

Abschließend wurde über eine Chromatin-Immunpräzipitation nachgewiesen, dass AP-2ε *in vivo* mit dem *COL2A1* Promotor an der Bindestelle AP-2.3 wechselwirkt. Aus einem Gel-Shift Assay mit *in vitro* translatiertem AP-2ε aus Retikulozytenlysaten wurde zudem deutlich, dass für die Interaktion sehr wahrscheinlich ein oder mehrere Chondrozyten-spezifische Kofaktoren nötig sind, da hier keine Bindung an das entsprechende Oligonukleotid festgestellt werden

konnte. Von anderen AP-2 Varianten ist bereits bekannt, dass deren Bindeverhalten bzw. intrinsische Aktivität durch verschiedene Kofaktoren reguliert werden kann (Roth *et al.*, 2000; Bamforth *et al.*, 2001; Braganca *et al.*, 2003; Wenke und Bosserhoff, 2010). Welcher Kofaktor speziell für die Bindung von AP-2 ϵ an den *COL2A1* Promotor in Knorpelzellen wichtig ist, kann an dieser Stelle aber nicht beantwortet werden.

Um eine Vorhersage zu machen, ob die *in vitro* stattfindende Inhibition von *COL2A1* durch AP-2 ϵ auch *in vivo* relevant ist, wurden verschiedene murine Gewebeproben aus WT und *Tfap2e* $-/-$ Mäusen, stellvertretend für unterschiedliche Stadien der Knorpeldifferenzierung, bezüglich ihrer Col2a1 Expressionsrate analysiert. Dabei wurde Col2a1 von Chondrozyten aus dem Epiphysenknorpel von neugeborenen *Tfap2e* $-/-$ Tieren in etwa doppelt so stark exprimiert wie von WT Tieren, was gut mit den *in vitro* Ergebnissen korreliert. Verglichen mit diesem Gewebetyp, wies adulter Gelenkknorpel sowie mesenchymale Extremitätenknospen nur eine etwa 30- bis 100-fach geringere Col2a1 Expression auf. Diese geringe Grundexpression offeriert eine mögliche Erklärung, warum der inhibitorische Effekt von AP-2 ϵ hier scheinbar nicht zum Tragen kommt.

3.2 Der Verlust von AP-2 ϵ führt zu keinen prägnanten Anormalitäten während der murinen Skelettentwicklung

Trotz der in humanen Knorpelzellen festgestellten Regulation von *CXCL1* und *COL2A1* durch AP-2 ϵ haben ausgewachsene *Tfap2e knockout* Mäuse keinen offensichtlich anormalen Phänotyp. Es wäre aber möglich, dass sich der Verlust von AP-2 ϵ auf bestimmte Stadien der embryonalen Skelettentwicklung auswirkt, jedoch im Verlauf der weiteren prä- und postnatalen Entwicklung durch kompensatorische Mechanismen wie Redundanz oder irreguläre Chondrozytendifferenzierung und/oder -proliferation ausgeglichen wird. In diesem Fall wären bei *Tfap2e* $-/-$ Embryonen im Vergleich zu WT Embryonen zeitlich begrenzt auftretende, morphologische Unterschiede zu erwarten, die wertvolle Information bezüglich der Funktion von AP-2 ϵ im Verlauf der Chondrogenese bzw. der enchondralen Ossifikation offerieren würden. Derartige transiente Anormalitäten konnten bereits bei mehreren *knockout* Mausmodellen für Moleküle, welche die Knorpelentwicklung beeinflussen, beobachtet werden. Beispielsweise zeigen Mäuse mit einem Chondrozyten-spezifischen Verlust von Mmp13 eine deutlich vergrößerte hypertrophe Zone in den embryonalen und frühen postnatalen Wachstumsfugen (Inada *et al.*, 2004; Stickens *et al.*, 2004). Dieser Phänotyp verschwindet aber spätestens im Alter von 12 Wochen, so dass die ausgewachsenen Tiere wiederum normal

erscheinen. Weitere Untersuchungen legten nahe, dass der Verlust von *Mmp13* während der Embryogenese teilweise durch *Mmp9* kompensiert wird (Stickens *et al.*, 2004). Ein weiteres Beispiel stellt die *MIA/CD-RAP* defiziente Maus dar, welche im adulten Zustand ebenfalls keinen manifesten Phänotyp aufweist. Nichtsdestotrotz konnten Schmid und Bosserhoff in einer aktuellen Studie zeigen, dass die *Femora* von *MIA* *-/-* Föten im Alter von 15,5 Tagen einen erhöhten Anteil proliferierender und einen reduzierten Anteil hypertropher Chondrozyten aufweisen (Schmid und Bosserhoff, 2014). Umgekehrt war die hypertrophe Zone in den *MIA* *-/-* Föten im Vergleich zum WT an Embryonaltag 16,5 erhöht, wodurch die zuvor verzögerte Differenzierung vollständig kompensiert wurde (Schmid und Bosserhoff, 2014).

Im Rahmen der embryonalen Analyse der *AP-2ε* defizienten Maus wurden zunächst ebenfalls 15,5 und 16,5 Tage alte Föten untersucht, um fortgeschrittene Stadien der Skelettentwicklung zu betrachten. Über den Abgleich von Gesamtgewicht und -größe sowie der *Femur*-Länge mit gleichaltrigen WT Föten konnte eine generelle Diskrepanz in der Entwicklungsgeschwindigkeit zwischen beiden Genotypen ausgeschlossen werden. Um darüber hinaus das Voranschreiten der Chondrozytendifferenzierung bzw. enchondralen Ossifikation zu beurteilen, wurden hypertrophe bzw. proliferative Chondrozyten in den *Femora* durch *in situ* Hybridisierung gegen die Marker *Col10a1* bzw. *Col2a1* visualisiert sowie der bereits verknöcherte Bereich in der Diaphyse optisch erfasst. Dabei wurden in den *Tfap2e* *-/-* Embryonen keine signifikanten Anomalitäten festgestellt, ausgenommen einer leicht vergrößerten hypertrophen Chondrozytenzone an Embryonaltag 16,5, was mit einer tendenziell kleineren verknöcherten Region einherging.

Das bedeutet, dass der Verlust von *AP-2ε* in diesen Stadien der Embryogenese nur geringgradige Effekte auf das Voranschreiten der murinen Skelettentwicklung hat. Man kann an dieser Stelle spekulieren, dass der Austritt aus der Hypertrophie sowie der Umbau der Knorpelmatrix zu trabekulärem Knochen in den *AP-2ε* defizienten Föten leicht verzögert ist. Selbiges war auch bei den weiter oben beschriebenen *Mmp13* *-/-* Embryonen der Grund für die vergrößerte hypertrophe Differenzierungszone, wenngleich der Effekt dort deutlich stärker war (Inada *et al.*, 2004; Stickens *et al.*, 2004). Da die Ergebnisse aus dem OA-Modell aber eine inhibitorische Wirkung von *AP-2ε* auf die Expression von *Mmp13* nahelegen (3.4), ist eine Fehlregulation dieses Enzyms als kausale Ursache für einen verspäteten Austritt aus der Hypertrophie bei *Tfap2e* *-/-* Tieren auszuschließen. Separat ist an dieser Stelle anzumerken, dass die bei der *in situ* Hybridisierung gemessene Expressionszone eines Gens nicht mit dessen tatsächlicher Expressionsstärke gleichzusetzen ist. Deshalb war im Hinblick auf die in humanen Chondrozyten festgestellte negative Regulation von *COL2A1* durch *AP-2ε* (3.1) auch keine

Diskrepanz in der Ausdehnung der *Col2a1* Expressionszone zu erwarten. Stattdessen müsste zur quantitativen Analyse der Expressionsstärke die Färbeintensitäten in Relation gesetzt werden. Dies war aufgrund des methodischen Ablaufs der *in situ* Hybridisierung (5.2.13) aber nicht realisierbar, da die Schnitte jeweils in separaten Kammern mit den Sonden hybridisiert wurden.

Die Morphogenese der Extremitäten in der Maus beginnt etwa an Embryonaltag 9, wobei sie bei den Hinterläufen zeitlich etwa einen halben Tag verzögert einsetzt (Wanek *et al.*, 1989; Taher *et al.*, 2011). 24 Stunden später sind die Extremitätenknospen morphologisch deutlich abgrenzbar und die Bildung von Knorpelgewebe setzt ein, das sich ab Embryonaltag 12,5 in allen Extremitätenknospen nachweisen lässt (Wanek *et al.*, 1989; Taher *et al.*, 2011). Ob AP-2 ϵ einen deutlicheren Einfluss auf diese initialen Stadien der murinen Gliedmaßenentwicklung hat, wurde mittels *Micromass* Kultivierung (5.6.5) von mesenchymalen Zellen aus den Extremitätenknospen von WT und *Tfap2e* $-/-$ Embryonen im Alter von ca. 11,5 Tagen adressiert. Bei den WT Tieren ließ sich auf mRNA-Ebene verifizieren, dass der Transkriptionsfaktor bereits in diesem Zelltyp exprimiert wird. Anschließend wurde das Differenzierungsverhalten der mesenchymalen Zellen neben der Anfärbung von Kulturen mit Alcian Blau über die Quantifizierung der Expression typischer Markergene analysiert. Dabei ging hervor, dass die Differenzierungsrate bei beiden Genotypen an Tag 1 bis 3 praktisch identisch war. Interessanterweise konnte jedoch an Tag vier der Kultivierung bei den *Tfap2e* $-/-$ Zellen eine leicht erhöhte Expression von *Col2a1* und eine jeweils 3- bis 4-fach höhere Expression von *Col10a1* und *Mmp13* detektiert werden. Bei den beiden Letzteren handelt es sich um charakteristische Marker hypertropher Chondrozyten (Linsenmayer *et al.*, 1988; Reichenberger *et al.*, 1991; D'Angelo *et al.*, 2000). Dass sich der Verlust von AP-2 ϵ insbesondere auf die Expression dieser Gene am Ende der Differenzierung auswirkt, könnte, neben der vergrößerten hypertrophen Zone in den *Femora*, ein Hinweis darauf sein, dass der Transkriptionsfaktor nur in stark differenzierten Chondrozyten, nicht aber in mesenchymalen Zellen und frühen Chondroblasten funktionell aktiv ist. Dies beruht möglicherweise auf dem Fehlen wichtiger Kofaktoren in frühen Knorpeldifferenzierungsstadien, welche für die Wirkung von AP-2 ϵ essentiell sind. Aus den *in vitro* Translataten im Rahmen der Analyse des humanen *COL2A1* Promotors (3.1) ging bereits hervor, dass an der Bindung von AP-2 ϵ an die Ziel-DNA weitere Faktoren beteiligt zu sein scheinen. Beispielsweise weiß man von RUNX2, dass der Transkriptionsfaktor für eine effektive Modulation der Genexpressionsrate auf den Koaktivator YAP (*yes-associated protein*) angewiesen ist (Yagi *et al.*, 1999). Interessanterweise enthält RUNX2 wie auch AP-2 ϵ ein PY-Motiv in seiner Transaktivierungsdomäne, über welches die

Interaktion mit YAP stattfindet (Yagi *et al.*, 1999). Somit könnte nicht nur die Interaktion von AP-2 ϵ mit der DNA, sondern auch die Modulation der Genexpression von Zielgenen durch spezifische Kofaktoren beeinflusst werden.

Alternativ dazu wäre auch denkbar, dass der Verlust von AP-2 ϵ in den nicht-hypertrophen Chondrozyten durch redundante Mechanismen vollständig kompensiert wird und sich deswegen bei den *Tfap2e* $-/-$ Embryonen in den frühen Knorpeldifferenzierungsstadien keinerlei Anomalitäten manifestieren. Diesbezüglich kommen vor allem andere Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-2 α in Betracht, welcher als Regulator der Chondrozytendifferenzierung beschrieben wurde und wie AP-2 ϵ bereits in den Extremitätenknospen exprimiert wird (Moser *et al.*, 1997a; Huang *et al.*, 2004).

Zusammengefasst konnte hier gezeigt werden, dass AP-2 ϵ zwar bereits in den mesenchymalen Zellen der Extremitätenknospen von 11,5 Tage alten WT Mausembryonen exprimiert wird, ein Ausschalten des Transkriptionsfaktors aber nur sehr geringfügige Abweichungen vom normalen murinen Entwicklungsschema nach sich zieht. Ob dies darin begründet ist, dass AP-2 ϵ in frühen chondrozytären Differenzierungsstadien generell nicht aktiv ist, oder der Verlust durch andere Faktoren kompensiert wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher analysiert.

3.3 Hypoxie als Induktor der AP-2 ϵ Expression

Bei WT Mäusen war die Expression von AP-2 ϵ in Chondrozyten aus neugeborenen Tieren im Vergleich zu den mesenchymalen Zellen der Extremitätenknospen um einen Faktor von etwa 10 erhöht. Ein Anstieg der AP-2 ϵ Expression wurde auch schon von Wenke und Kollegen in späten Differenzierungsstadien von hMSC-Sphäroidkulturen *in vitro* beobachtet (Wenke *et al.*, 2009).

Diese Daten legen nahe, dass es im Verlauf der Chondrogenese ausgehend von mesenchymalen Zellen generell zu einer Induktion der AP-2 ϵ Expression kommt. *In vitro* wird die Expression von Transkriptionsfaktoren in mesenchymalen Zellen und Chondrozyten unter anderem durch physikalische Einwirkungen, d.h. mechanische Belastung und relative Sauerstoffkonzentration, reguliert (Schipani, 2005; Kelly und Jacobs, 2010; Responde *et al.*, 2012). Dass mechanische Stimuli und Hypoxie auch *in utero* für die regelrechte Entwicklung des Embryos relevant sind, wurde in zahlreichen Studien belegt (Schipani *et al.*, 2001; Lamb *et al.*, 2003; Schipani, 2005; Nowlan *et al.*, 2010; Roddy *et al.*, 2011).

Mit hMSC-Sphäroiden als Modellsystem wurde der Einfluss zyklischer, hydrostatischer Belastung auf die Expression von AP-2 ϵ in einem Langzeit- und einem Kurzzeitexperiment

analysiert. Für die Versuche wurde diese Form der Belastung gewählt, da bereits bekannt war, dass sie die chondrogene Differenzierung von hMSC sowie von mesenchymalen Zellen aus murinen Extremitätenknospen fördert (Takahashi *et al.*, 1998; Angele *et al.*, 2003; Angele *et al.*, 2004). Bei beiden Versuchsansätzen ließ sich jedoch keine Zunahme der AP-2 ϵ Transkriptionsrate im Vergleich zu den unbelasteten Kontrollen beobachten. Wie erwartet konnte aber in Übereinstimmung mit der Literatur eine Induktion der Col2a1 bzw. der Sox9 Expression als Reaktion auf die Belastung festgestellt werden (Takahashi *et al.*, 1998; Angele *et al.*, 2004; Finger *et al.*, 2007).

Im Folgenden sei kurz erörtert, warum bei der zugehörigen qRT-PCR Analyse nicht β -Aktin, sondern GAPDH (*Glyceraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase*) als interne Referenz verwendet wurde. Da β -Aktin einen integralen Bestandteil des Zytoskeletts einer Zelle darstellt, ist es nicht unwahrscheinlich, dass die Expression des Gens durch hydrostatische Belastung reguliert wird. Tatsächlich konnte insbesondere bei den Kurzzeitexperimenten unter Verwendung identischer cDNA-Mengen eine Schwankung der β -Aktin *crossing points* infolge der Belastung detektiert werden. Im Gegensatz dazu war die Expression von GAPDH stabil. Auch bei zahlreichen veröffentlichten Studien zur hydrostatischen Belastung von hMSC wurde GAPDH und nicht β -Aktin als interne Referenz herangezogen (Angele *et al.*, 2004; Schumann *et al.*, 2006; Puetzer *et al.*, 2013). Aufgrund der Ergebnisse aus diesem Modellversuch waren mechanische Stimuli als genereller Induktor der AP-2 ϵ Expression relativ unwahrscheinlich.

Interessanterweise stand jedoch die Expression des Hypoxiemarkergens *Angptl4* in Korrelation zu dem während der murinen Knorpelentwicklung beobachteten Anstieg von AP-2 ϵ . Es ist bekannt, dass die Expression von *Angptl4* im Knorpel und anderen Geweben stark von der Sauerstoffkonzentration und von der Aktivität von HIF-1 abhängig ist (Murata *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012). Da die Konzentration von HIF-1 α primär posttranslational reguliert wird, wurde die Aktivität des HIF-1 Transkriptionsfaktorkomplexes indirekt über die Expression dieses Markergens und nicht über eine Messung der HIF-1 α mRNA Expression adressiert (Kallio *et al.*, 1999; Masson und Ratcliffe, 2003). Provot und Kollegen konnten nachweisen, dass der HIF-1 Komplex bereits in den frühen mesenchymalen Kondensationen der Extremitätenknospen transkriptionell aktiv ist (Provot *et al.*, 2007). Aufgrund der starken Matrix-Synthese ist davon auszugehen, dass im Laufe der Knorpelentwicklung die Sauerstoffversorgung der Zellen weiter sinkt und die Aktivität von HIF-1 somit weiter ansteigt. Diesbezüglich ist bekannt, dass in differenziertem Knorpelgewebe mit zunehmender Tiefe eine Sauerstoffkonzentration von nur 1 bis 5 % herrscht und das Gewebe somit stark hypoxisch ist (Silver, 1975; Muir, 1995; Kellner *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2004).

Im Rahmen der weiteren Analyse kam es auch bei der Differenzierung von dreidimensionalen Stammzellaggregaten, neben der erwarteten AP-2 ϵ Induktion (Wenke *et al.*, 2009), zu einer gleichzeitigen Steigerung der Angptl4 Expression. Letzteres legt nahe, dass auch bei diesem *in vitro* Ansatz die Sauerstoffversorgung der Zellen im Inneren der sphäroidalen Kulturen im Zuge der Differenzierung konstant abnimmt. Dies könnte ebenfalls an der Produktion von extrazellulärer Matrix sowie an einer zunehmenden Zusammenlagerung der Zellen in den Aggregaten liegen. Über Inkubation bei 1 % atmosphärischer Sauerstoffkonzentration sowie die Eisenchelatoren DP/DFX wurde nachgewiesen, dass die Expression von AP-2 ϵ *in vitro* tatsächlich durch Hypoxie reguliert wird. Letztere wurden auch in einer Vielzahl anderer Studien zur Induktion Hypoxie-abhängiger Prozesse verwendet (Kallio *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2010). Weiterhin machte der si_RNA vermittelten *knockdown* von HIF-1 α deutlich, dass die Induktion der AP-2 ϵ Expression auf molekularer Ebene, wie vermutet, durch den HIF-1 Komplex vermittelt wird.

Die Existenz von zwei HIF Bindemotiven (5'-RCGTG-3') im murinen *Tfap2e* Promotor (-1 bis -1500 bp relativ zum Transkriptionsstart) spricht dafür, dass *Tfap2e* ein direktes Zielgen von HIF-1 ist. Auch bei der humanen Sequenz kommen mehrere dieser Motive vor. Dagegen spricht, dass die Positionen der Motive zwischen den Spezies nicht direkt konserviert sind und weiter, dass eine laut Kimura und Kollegen für die Funktionalität von HIF Bindestellen nötige HAS (*HIF1 ancillary sequence*) Sequenz (5'-CAGGT-3') nicht in unmittelbarer Nähe der HIF Bindemotive im *Tfap2e* Promotor zu finden ist (Kimura *et al.*, 2000). Im Hinblick auf eine indirekte Regulation der AP-2 ϵ Expression durch Hypoxie kommt insbesondere Sox9 als zwischengeschalteter Faktor in Frage. Eine Reihe von Studien belegen, dass Sox9 ein direktes Zielgen von HIF-1 α ist und dessen Expression in Chondrozyten sowie in mesenchymalen Stammzellen durch Hypoxie induziert wird (Robins *et al.*, 2005; Amarilio *et al.*, 2007; Duval *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Gleichzeitig konnte von Wenke und Kollegen eine positive Regulation der *TFAP2E* Promotoraktivität und Expression durch Sox9 beobachtet werden (Wenke *et al.*, 2009). Sox9 könnte also ein Bindeglied zwischen HIF-1 und dem Hypoxie-abhängigen Anstieg der AP-2 ϵ Expression darstellen.

In diesem Abschnitt konnte also *in vitro* gezeigt werden, dass die Expression von AP-2 ϵ durch Hypoxie über den Transkriptionsfaktorkomplex HIF-1 induziert wird. Dies geschieht direkt oder indirekt über einen zwischengeschalteten Faktor, wie z.B. Sox9. Dass *in vivo* die Sauerstoffversorgung der Zellen während der Knorpelmorphogenese abnimmt bzw. die Aktivität von HIF-1 zunimmt, wurde durch das Expressionsmuster von Angptl4 signalisiert. Dies ist in Abbildung 3.1 zusammengefasst. Abschließend ist anzumerken, dass an dieser Stelle

nicht auszuschließen ist, dass neben der Sauerstoffkonzentration auch noch andere extrazelluläre Regulatoren, wie z.B. parakrine Signalemoleküle, die Expression von AP-2 ϵ beeinflussen. Deren Analyse war jedoch nicht mehr Teil dieser Arbeit.

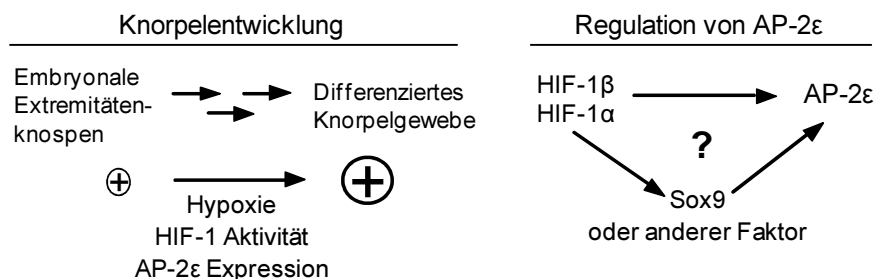


Abb. 3.1: Schema zur Regulation der AP-2 ϵ Expression durch Hypoxie

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit legen nahe, dass die Expression von AP-2 ϵ im Verlauf der Knorpelentwicklung durch eine Reduktion der Sauerstoffkonzentration einhergehend mit einer Steigerung der HIF-1 Aktivität induziert wird. Dies geschieht über eine direkte oder indirekte (möglicherweise über Sox9) Interaktion des HIF-1 Komplexes mit regulatorischen Elementen des Gens für AP-2 ϵ .

3.4 AP-2 ϵ als Inhibitor der Mmp13 Expression im murinen Gelenkknorpel

Da beim Vergleich der embryonalen Skelettentwicklung zwischen *Tfap2e* $-/-$ und WT Mäusen keine prägnanten Unterschiede festgestellt werden konnten (3.2), wurde als nächstes untersucht, ob sich der Verlust von AP-2 ϵ möglicherweise stärker auf die Morphologie oder Homöostase von adultem Knorpelgewebe auswirkt. Dazu wurde zunächst der artikuläre Knorpelüberzug im Kniegelenk von 10 Wochen alten WT und *Tfap2e* $-/-$ Mäusen auf histologischer und ultrastruktureller Ebene analysiert, unter physiologischen Bedingungen aber keine offensichtlichen Anormalitäten festgestellt. Allerdings konnte nach Induktion einer Osteoarthritis durch Destabilisation des medialen Meniskus (DMM) eine signifikant verstärkte Progression der Krankheit in den AP-2 ϵ defizienten Mäusen beobachtet werden.

Auch bei anderen Mausmodellen mit einem *knockout* Knorpel-assoziiierter Gene ließ sich nach Induktion einer Osteoarthritis eine klar vom WT abgrenzbare Ausprägung der Krankheit feststellen, obgleich die Tieren im adulten Stadium keine phänotypischen Abnormalitäten aufwiesen. Je nachdem, ob die Gendeletion mit einem schwereren oder milderen Verlauf der OA einherging, konnte auf eine protektive oder krankheitsfördernde Rolle des zugehörigen Proteins geschlossen werden. Beispiele hierfür sind die *Mmp13*, die *MIA/CD-RAP* und die *MK2* (MAPKAP kinase 2) *knockout* Maus sowie die heterozygote *Runx2* $+/-$ Maus (Kamekura

et al., 2006; Glasson, 2007; Little *et al.*, 2009; Schmid *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013). Demzufolge scheint das artikuläre Knorpelgewebe insbesondere unter pathophysiologischen Bedingungen auf das Fehlen bestimmter Genprodukte zu reagieren. Dies wurde nun auch hier bei der AP-2 ϵ defizienten Maus deutlich. Es stellte sich die Frage, warum der Verlust von AP-2 ϵ mit einer verstärkten Ausprägung einer induzierten Osteoarthritis einherging.

Bei OA-Patienten kann häufig das Auftreten apoptotischer Zellen in den betroffenen Knorpelregionen beobachtet werden (Goggs *et al.*, 2003; Aigner *et al.*, 2004; Kuhn *et al.*, 2004). Zu Beginn des Apoptoseprogramms werden sogenannte Initiator-Caspasen aktiviert, welche anschließend die *pro*-Formen nachgeschalteter Effektor-Caspasen, wie z.B. Caspase 3, spalten. Letztere werden dadurch aktiviert und katalysieren dann die proteolytische Spaltung einer Vielzahl zellulärer Proteine, was mit dem Tod der Zelle einhergeht (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1994; Nicholson *et al.*, 1995). Eine erhöhte Apoptoserate wurde zudem bei mehreren AP-2 *knockout* Mausmodellen beschrieben und hätte somit eine Verbindung zwischen der verstärkten OA-Progression und dem Verlust von AP-2 ϵ darstellen können. Beispielsweise wurde bei *Tfap2d* $-/-$ Embryonen eine hohe Anzahl apoptotischer Zellen innerhalb bestimmter Areale des Mittelhirns detektiert, wodurch die regelrechte Morphogenese der *Colliculi inferiores* unterbrochen wird (Hesse *et al.*, 2011). Ähnlich ist Apoptose der Grund für die polyzystische Nierendeformation bei AP-2 β defizienten Mäusen und steht mit dem nicht stattfindenden Verschluss des Schädeldachs bei *Tfap2a* $-/-$ Embryonen in Verbindung (Schorle *et al.*, 1996; Moser *et al.*, 1997b). Wie für eine OA typisch, ließen sich bei dem hier verwendeten OA-Modell 17 Tage nach der DMM-Operation einzelne apoptotische Zellen im artikulären Knorpel der Mäuse mittels Immunhistochemie gegen *Cleaved Caspase 3* nachweisen. Diese waren jedoch bei beiden Genotypen zu beobachten und es gab keine Hinweise für eine erhöhte Apoptoserate im Gelenkknorpel der *Tfap2e* $-/-$ Tiere. Dass an Tag 10 keinerlei apoptotische Zellen zu beobachten waren, ist wahrscheinlich in der zu diesem Zeitpunkt noch relativ schwachen Ausprägung der Osteoarthritis begründet. Diese Ergebnisse schlossen Apoptose als molekulare Ursache für die verstärkte OA-Progression in den AP-2 ϵ defizienten Tieren aus.

Aufgrund der stark heterogenen Natur der Erkrankung gibt es auf molekularer Ebene keine charakteristischen Markergene, die bei allen OA-Subtypen einheitlich differentiell exprimiert werden (Goldring und Goldring, 2007). Die Familie der Matrix-Metalloproteinasen beinhaltet aber entscheidende Mediatoren der degenerativen Prozesse, die im Verlauf einer Osteoarthritis auftreten. Kausal wurde dabei MMP13 als das wichtigste ECM-degradierende Enzym identifiziert, welches sehr häufig im betroffenen Knorpelgewebe von OA-Patienten verstärkt exprimiert wird (Shlopov *et al.*, 2000; Aigner *et al.*, 2001; van der Kraan und van den Berg,

2012). Daneben ist auch von anderen MMP Varianten wie MMP1 und MMP3 eine Rolle bei der OA-Progression im Menschen bekannt (Billinghurst *et al.*, 1997; Shlopov *et al.*, 1997; Goldring und Goldring, 2007). Im Rahmen des hier angewendeten Modells konnte Mmp1 aber selbst nach Induktion der OA nicht im murinen Gelenkknorpel detektiert werden. Mmp3 und Mmp13 wurden hingegen exprimiert und die Expression von Mmp13 war in den DMM-Gelenken im Vergleich zu den Kontrollen an Tag 17 signifikant erhöht. Unter vergleichbarer experimenteller Vorgehensweise wurde auch von Kamekura und Kollegen 2 Wochen nach Induktion der OA eine deutliche Zunahme der Mmp13 Expression beobachtet (Kamekura *et al.*, 2005). Neben der rein histologischen Analyse konnten somit OA-typische Veränderungen im artikulären Knorpel der Mäuse auf molekularer Ebene bestätigt werden. Dies ist ein wichtiger Punkt, da laut Goldring und Goldring keine der verfügbaren Techniken zur Induktion einer Osteoarthritis im Tiermodell die Krankheit im Menschen zu 100 Prozent widerspiegelt (Goldring und Goldring, 2007). Daher zeigt der Anstieg der Mmp13 Expression in den DMM-Gelenken, dass das angewendete murine Modellsystem einen der wichtigsten molekularen Prozesse im Verlauf einer OA beim Menschen reflektiert.

Es fiel jedoch auf, dass die Expression von Mmp13 in den behandelten Gelenken bei beiden Genotypen ähnlich stark anstieg. Tendenziell war der Induktionsgrad in den *Tfap2e* *-/-* Mäusen sogar niedriger als bei den WT Tieren, was eher einen milderen Krankheitsverlauf vermuten lässt. Eine überdurchschnittliche starke Zunahme der Expression von Mmp13 in den *Tfap2e knockout* Mäusen im Verlauf des OA-Modells konnte also nicht für die verstärkte Progression der Erkrankung in den Tieren verantwortlich sein. Überraschenderweise war aber die physiologische Grundexpression von Mmp13 im artikulären Knorpel der AP-2 ϵ defizienten Mäuse in etwa dreimal höher als bei den WT Tieren. Dies ging sowohl aus dem Vergleich der Kontrollgelenke aus dem OA-Modell als auch aus den Kniegelenken völlig unbehandelter Tiere hervor. Studien an Menschen, Schweinen und Ratten belegen eine geringgradige aber konstitutive Expression von MMP13/Mmp13 im gesunden Gelenkknorpel (Reboul *et al.*, 1996; Shlopov *et al.*, 1997; Forsyth *et al.*, 2005; Appleton *et al.*, 2007). Hier ist die Protease an der Homöostase des Gewebes beteiligt, indem sie die Degradation von alten ECM-Bestandteilen katalysiert, welche anschließend durch neu-synthetisierte Moleküle ersetzt werden (Appleton *et al.*, 2007; Guilak, 2011; Pulsatelli *et al.*, 2013). Interessanterweise konnte schon zuvor im Spätstadium der Differenzierung von mesenchymalen *Tfap2e* *-/-* Zellen aus den Extremitätenknospen eine starke Expression der Protease als bei korrelierenden WT Zellen detektiert werden (3.2). Insgesamt legen diese Daten nahe, dass es in artikulären bzw. stark differenzierten murinen Chondrozyten nach einer Deletion des Transkriptionsfaktors AP-2 ϵ zu einer Induktion

der Mmp13 Expression kommt. Hieraus kann gefolgert werden, dass AP-2 ϵ die Expression von Mmp13 negativ regulieren muss.

Im Rahmen der weiteren Analyse wurde die Expression der endogenen Mmp-Inhibitoren Timp1, -2, und -3 im Gelenkknorpel der *Tfap2e* $-/-$ und WT Tiere verglichen. Eine ebenfalls erhöhte Expression dieser Proteine hätte die gesteigerte Mmp13 Expression im Knorpel der *Tfap2e* $-/-$ Mäusen relativieren können, was jedoch nicht der Fall war. Dazu binden die Faktoren innerhalb des katalytischen Zentrums von Matrix-Metalloproteinasen und komplexieren das für die proteolytische Funktion essentielle Zn²⁺ Atom, was in einer Inaktivierung der Enzyme resultiert (Bode *et al.*, 1999; Nagase *et al.*, 2006). *In vitro* wurde die Aktivität von rekombinantem MMP13 mit einer Stöchiometrie von 1:1 durch TIMP1, -2 und -3 inhibiert (Knauper *et al.*, 1996; Knauper *et al.*, 1997). Weiterhin zeigen Timp3 defiziente Mäuse im Alter von 6 Monaten eine verstärkte Mmp-vermittelte Degradation von Aggrecan bzw. Kollagen (Sahebjam *et al.*, 2007).

Daneben hängt die Aktivität von Mmp13 von einem weiteren Kriterium ab. Das Enzym wird von Zellen als inaktives Zymogen sekretiert und bedarf der Abspaltung einer sogenannten Pro-Domäne aus ca. 80 Aminosäuren, bevor es als Protease fungieren kann. Erst danach wird das katalytische Zentrum der Endopeptidase für Substrate zugänglich (Cawston, 1996; Ra und Parks, 2007; Krane und Inada, 2008). Deshalb war es nötig zu zeigen, dass die erhöhte Mmp13 mRNA Expression bei den *Tfap2e* $-/-$ Mäusen auch mit einer gesteigerten extrazellulären Aktivität der Protease in Korrelation stand. Dies wurde über eine direkte Aktivitätsmessung sowie über die Bestimmung der Menge an freigesetzten Glykosaminoglykanen (GAG) in den Überständen von artikulären Knorpelimplantaten adressiert. Tatsächlich waren beide Parameter bei den AP-2 ϵ defizienten Mäusen im Vergleich zum WT deutlich erhöht. In beiden Fällen bestätigte ein spezifischer Inhibitor, dass Mmp13 für die Unterschiede zwischen den Genotypen hauptverantwortlich sein musste.

In der Summe legen die Ergebnisse nahe, dass AP-2 ϵ die Expression von *Mmp13* negativ reguliert und es aufgrund dessen zu einer erhöhten Grundexpression sowie -aktivität der Protease im Gelenkknorpel der *Tfap2e* $-/-$ Mäuse kommt. Höchstwahrscheinlich verschiebt sich hierdurch das physiologische Gleichgewicht aus ECM-Degradation und -Neusynthese auf die katabole Seite, was auf Dauer zu einer Störung der Funktionalität und Integrität des artikulären Knorpels führt. Wie aus dem OA-Modell hervorging, äußert sich dies in einer erhöhten Suzeptibilität des Gewebes gegenüber einer Überlastung sowie einer stärkeren Schädigung des Gewebes unter pathophysiologischen Bedingungen.

Dass eine dauerhaft erhöhte Expression von Mmp13 die Entstehung bzw. Entwicklung einer Osteoarthritis begünstigen kann, wurde in Mäusen mit einem *Mmp13* Transgen nachgewiesen. Nach 4 bis 5 monatiger Überexpression der Protease traten in den Kniegelenken der transgenen Tiere deutliche Schäden am artikulären Knorpel auf (Neuhold *et al.*, 2001). Dieser Theorie nach wäre bei *Tfap2e* *-/-* Tieren in hohem Alter ein vermehrtes Auftreten spontaner, OA-typischer Veränderungen zu erwarten. Selbiges konnte bei anderen gentechnisch veränderten Mäusen beobachtet werden. Beispielsweise entwickeln sich Tiere mit einer homozygoten Deletion des *Itga1* (*integrin alpha 1*) Gens wie *Tfap2e* *knockout* Mäuse normal und zeigen im Alter von weniger als 4 Monaten keine phänotypischen Abnormalitäten (Gardner *et al.*, 1996). Allerdings trat bei 9 Monate alten *Itga1* *-/-* Tieren deutlich häufiger eine spontane OA auf als bei gleichaltrigen WT Tieren (Zemmyo *et al.*, 2003). Weitere Beispiele für das verstärkte Auftreten einer spontanen OA mit zunehmendem Alter ist die Biglycan bzw. Fibromodulin defiziente Maus und der STR/ort Mausstamm (Ameys *et al.*, 2002; Ameys und Young, 2002; Kyostio-Moore *et al.*, 2011). Der Grund warum im Gelenkknorpel der hier analysierten *Tfap2e* *-/-* Tiere unter physiologischen Bedingungen keine Unterschiede im Vergleich zu WT Tieren zu beobachten waren, lag also möglicherweise am noch relativ niedrigen Alter der Tiere von ca. 10 Wochen.

Wie bereits erwähnt konnte bei OA-Patienten im Vergleich zu gesunden Menschen eine gesteigerte AP-2 ϵ Expression beobachtet werden (Wenke *et al.*, 2009). Selbiges war auch beim analogen Vergleich der OA-Gelenke mit den unbehandelten Gelenken der WT Mäuse festzustellen. Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge wirkt AP-2 ϵ der Ausprägung einer OA entgegen. Demnach könnte diese Induktion der AP-2 ϵ Expression einen protektiven Mechanismus des artikulären Knorpelgewebes darstellen, der nach Einsetzen der OA der weiteren Progression der Erkrankung entgegenwirken soll.

Abschließend soll diskutiert werden, welcher molekulare Prozess der erhöhten Mmp13 Grundexpression im Gelenkknorpel der *Tfap2e* *knockout* Mäusen zugrunde liegen könnte. Von Knorpelzellen produzierte Zytokine, insbesondere Tnf und Il-1 β , sind dafür bekannt auto- und parakrin die katabole Aktivität der Zellen über den NF κ B (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1*) oder den MAPK Signalweg zu steigern. *In vitro* resultierte die Behandlung von Chondrozyten mit Tnf bzw. Il-1 β in einer verstärkten Mmp13 Expression (Tardif *et al.*, 1999; Mengshol *et al.*, 2000; Tetlow *et al.*, 2001). Im Knorpel von unbehandelten AP-2 ϵ defizienten Mäusen konnte jedoch keine erhöhte Tnf oder Il-1 β Expression festgestellt werden, so dass eine Fehlregulation dieser Zytokine nicht für die starke Mmp13 Expression verantwortlich sein kann.

Daneben wäre es möglich, dass die Fehlregulation von Mmp13 mit potentiell auftretenden hypertrophen Differenzierungsprozessen im Gelenkknorpel der AP-2 ϵ defizienten Mäuse zusammenhängt. In der Regel wird die Differenzierung von artikulären Chondrozyten zu hypertrophen bzw. terminalen Chondrozyten aktiv unterdrückt (Yang *et al.*, 2001; van der Kraan und van den Berg, 2012). Bei verschiedenen *knockout* Mausmodellen, wie z.B. der Smad3 defizienten Maus, war jedoch eine anormale hypertrophe Differenzierung von artikulären Chondrozyten nachweisbar, was mit einer erhöhten OA-Suzeptibilität einherging (Yang *et al.*, 2001). Aufgrund der möglichen Verbindung zwischen Hypertrophie und AP-2 ϵ wurde dieser Aspekt auch hier über eine Expressionsanalyse von Col10a1 untersucht (Wenke *et al.*, 2009). Normalerweise wird Typ 10 Kollagen nur von hypertrophen Chondrozyten produziert, in denen auch Mmp13 stark exprimiert wird (Castagnola *et al.*, 1986; Linsenmayer *et al.*, 1988; Reichenberger *et al.*, 1991). Wäre das Eintreten von artikulären Knorpelzellen in die Hypertrophie bei den *Tfap2e* $-/-$ Mäusen für die erhöhte Expression von Mmp13 und die verstärkte OA-Progression verantwortlich, sollte dies mit der Expression von Typ 10 Kollagen im Gelenkknorpel der Tiere einhergehen. Interessanterweise konnte Col10a1 via qRT-PCR sowohl im Gelenkknorpel der unbehandelten WT als auch der *Tfap2e* $-/-$ Tiere detektiert werden, allerdings gab es zwischen den beiden Genotypen keine Unterschiede. Eine Literaturrecherche diesbezüglich ließ jedoch erkennen, dass eine geringe Zahl hypertropher Chondrozyten auch unter physiologischen Bedingungen in den tiefen, kalzifizierten Schichten des artikulären Knorpels an der Grenze zum subchondralen Knochen vorkommt. Selbiges wurde bei Hunden und Mäusen sowie beim Menschen beschrieben (Gannon *et al.*, 1991; Stephens *et al.*, 1992; Sahebjam *et al.*, 2007). Sehr wahrscheinlich stammt das gemessene Col10a1 Signal also von diesen Zellen.

Da die erhöhte Mmp13 Grundexpression im Gelenkknorpel der *Tfap2e* $-/-$ Mäuse demnach nicht mit der gleichzeitigen Überexpression kataboler Zytokine bzw. dem Auftreten hypertropher Differenzierung zusammenhängt, ist an dieser Stelle ein direkterer Regulationsmechanismus wahrscheinlicher. Diesbezüglich wurde ein 2000 Basenpaare umfassender Promotorbereich im 5'-Bereich des *Mmp13* Gens auf die Existenz von AP-2 Bindestellen hin untersucht. Innerhalb der Region konnten jedoch keine entsprechenden Sequenzmotive lokalisiert werden. Einerseits kann aufgrund dessen eine direkte Regulation von *Mmp13* durch AP-2 ϵ nicht vollkommen ausgeschlossen werden, da Transkriptionsfaktoren auch an regulatorische Elemente in relativ großem Abstand zur kodierenden Region eines Gen binden und die Transkriptionsrate auf diese Weise modulieren können (Klug *et al.*, 2007). Andererseits weisen gerade die 500 Basenpaare am proximalen Ende des *Mmp13/MMP13*

Promotors beim Vergleich verschiedener Säugetierspezies (Mensch, Maus, Ratte, Kuh, Hund) eine starke Konservierung auf, was eine Regulation in diesem Bereich am wahrscheinlichsten macht. Es konnten bereits eine Reihe von Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die innerhalb dieser 500 bp Region an die Promotorsequenz binden und so die Expression der Protease regulieren. Einer dieser Faktoren ist Runx2. Sowohl bei der Maus als auch beim Menschen und beim Kaninchen findet sich ein konserviertes Runx2 Erkennungsmotiv, über welches der Transkriptionsfaktor an den *Mmp13/MMP13* Promotor bindet und so dessen Aktivität steigert (Jimenez *et al.*, 1999). Zudem kam es nach Überexpression von RUNX2 in der Osteosarkom-Zelllinie MG-63 sowie in humanen Chondrozyten zu einer deutlich erhöhten Expression der Protease (Jimenez *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2004). Unweit der Runx2 Bindestelle befindet sich zudem ein konserviertes AP-1 (*activator protein 1*) Bindemotiv, über welches AP-1 Faktoren wie c-Jun und c-Fos die *Mmp13* Transkriptionsrate positiv modulieren (Pendas *et al.*, 1997; Tardif *et al.*, 1997; Goldring, 2012). Studien von Hess und Kollegen zeigen, dass für eine effiziente Induktion der humanen MMP13 Expression die simultane Anwesenheit beider Faktoren wichtig ist und weiter, dass dafür eine direkte Interaktion zwischen RUNX2 und AP-1 essentiell ist (Hess *et al.*, 2001). Auch Mengshol und Kollegen postulieren eine synergistische Aktivierung des *MMP13* Promotors durch RUNX2 und AP-1, begründet auf Mutationsanalysen der entsprechenden Bindemotive (Mengshol *et al.*, 2001). Weitere direkte Aktivatoren der *Mmp13/MMP13* Transkriptionsrate in murinen bzw. humanen Chondrozyten sind HIF-2 α , Lef-1 (*lymphoid enhancer-binding factor 1*) sowie Mitglieder der Ets (*E26 transformation-specific*) Transkriptionsfaktorfamilie (Yun und Im, 2007; Yang *et al.*, 2010; Otero *et al.*, 2012; Hashimoto *et al.*, 2013). Darüber hinaus wird die Expression von *Mmp13/MMP13* zusätzlich über epigenetische und post-transkriptionelle Mechanismen, wie DNA-Methylierung an spezifischen CpG Dinukleotiden oder microRNA-vermittelter Degradation der MMP13 mRNA, moduliert (Roach *et al.*, 2005; Tardif *et al.*, 2009; Akhtar *et al.*, 2010; Hashimoto *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2013). Es wäre denkbar, dass AP-2 ϵ *upstream* von einem der beschriebenen *Mmp13* Aktivatoren wirkt und dessen Expression negativ reguliert. Als Konsequenz würde AP-2 ϵ indirekt inhibitorisch auf *Mmp13* wirken, was die erhöhte Expression in den *Tfap2e* $-/-$ Tieren plausibel macht. Alternativ könnte AP-2 ϵ , ähnlich wie bei AP-1 und RUNX2 beobachtet, auf Proteinebene mit einem der Faktoren interagieren und so dessen Aktivität modulieren oder die epigenetische bzw. posttranskriptionelle Regulation der *Mmp13* Expression beeinflussen. Wie genau AP-2 ϵ die Transkriptionsrate von *Mmp13* schlussendlich beeinflusst, bedarf derzeit noch einer eingehenderen Untersuchung.

4 Material

4.1 Allgemeine Materialien

Active Motif, Carlsbad, USA	CHIP-IT™ Control Kit - Human, CHIP-IT™ Express Enzymatic
Aligent Tec., Santa Clara, USA	QuickChange™ II Site-Directed Mutagenesis
AnaSpec, Fremont, USA	SensoLyte® 520 MMP - 13 Assay Kit *Fluorimetric*
AppliChem GmbH, Darmstadt	Levamisol-Hydrochlorid, Proteinase K, t-RNA aus Hefe
B. Braun Melsungen AG, Melsungen	Aqua injectable, isotone Natriumchloridlösung (0,9 %)
BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	BD Atlas™ Glass Hybridization Chambers, Einmalartikel für Zellkultur, ITS™ Premix, Round-Bottom Tubes
Bio-Rad Laboratories GmbH, München	Immun-Blot™ PVDF Membran, Precision Plus Protein™ Standards Kaleidoscope™
Biozym Scientific GmbH, Oldendorf	Biozym LE Agarose
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	Ethidiumbromid, RNase Away™, Roti® Load 4x
Corning Inc., Corning, USA	6-well, 24-well und 96-well Platten, Zellkulturflaschen
Dako Deutschland GmbH, Hamburg	ARK™ (Animal Research Kit) Peroxidase, EnVision™+ HRP Rabbit (DAB+)
Epicentre, Madison, USA	FailSafe PCR 2x PreMix D
Euro-Diagnostica, Malmö, Schweden	Wieslab® sGAG quantitative kit
Fine Science Tools GmbH, Heidelberg	Operationsbesteck
GE Health Care, Little Chalfont, UK	Illustra Sephadex G-50 NICK™ Columns
Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm	dNTP Mastermix
Gilson, Inc., Middleton, USA	Pipetman Classic™ Pipetten
Humanzyme, Chicago, USA	Recombinant Human TGF-β3
J.T. Baker, Griesheim	Ethanol und alle weiteren flüssigen Chemikalien
Langenbrinck, Emmendingen	Glas-Objektträger
Life Technologies, Carlsbad, USA	Dispase, Lipofectamine® 2000, Lipofectamine® LTX Reagent, Lipofectamine® PLUS™ Reagent, Lipofectamine® RNAiMAX, SuperScript™ II Reverse Transcriptase, TrackIt™ 100 bp und 1 kb DNA Ladder
Merck KGaA, Darmstadt	Eosin Y, Hämatoxylin, MMP-13 Inhibitor (# 444283)

MATERIAL

Neo-Lab, Wheaton, USA	2,3 ml Glasgefäße für hydrostatische Belastung
New England Biolabs, Ipswich, USA	Restriktionsendonukleasen, T4 DNA Ligase
Nunc, Wiesbaden	96-well Platten für BCA Messungen, Nunc® MicroWell™ 96-well polypropylene V-bottom plates
Omega Bio-Tek, Norcross, USA	E.Z.N.A.® Total und MicroElute® Total RNA Kit
PAA Laboratories Inc., Dartmouth, USA	DMEM high glucose (4,5 g/l), DMEM low glucose (1 g/l), DMEM/Ham's F12 (1:1), PBS für Zellkultur
PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach	Fetales Kälberserum (FKS), Penicillin/Streptomycin
PerkinElmer, Waltham, USA	Easy Tides® [γ - ³² P]-dATP (6000 Ci/mmol)
Pierce/Peribo Science, Bonn	BCA-Protein-Assay Kit
Promega, Madison, USA	AP-2 Consensus Oligonucleotide, Dual-Luciferase® Assay System, pGL2-Basic, pGL3-Basic, pGL3-Promoter und pRL-TK Vektor, TNT® T7 Quick Coupled Transcription/ Translation System
Qiagen, Hilden	HiSpeed™ Plasmid Midi Kit, QIAamp® DNA Mini Kit, QIAquick® Gel Extraction Kit, siRNAs
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Blocking Reagent, BM Purple AP Substrate precipitating, Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets, DIG RNA Labeling Mix (10x), dN6 Primer, LightCycler® Kapillaren, LightCycler® 480 SYBR Green I Master, LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 white, Polynucleotid Kinase, RNase A, Taq® DNA Polymerase
Serumwerk Bernburg AG, Bernburg	Xylazin (20 mg/ml)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	5 M Betaine (PCR Reagent), Amphotericin-B, Acrylamid- Lösung (30 und 40 %), Agar, Bromphenolblau, BSA, DEPC, DFX, DP, DMSO, DTT, Milchpulver, Nonidet® P- 40, Oligonukleotide, Poly(dI-dC), SDS, TEMED, Trypsin, Trypton, Tween-20, Vitamin-Mix, alle nicht aufgeführten Chemikalien in Pulverform (p.a.)
Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest	Standard-Pelletfutter (Ssniff® R/M-H #V1534-0)
Takara Bio Inc., Shiga, Japan	SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time)
Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	CryoTubes™, DNase I (1 U/μl) Nalgene "Mr. Frosty" Freezing Container, RiboLock™ RNase Inhibitor, Super- frost Plus Objektträger, SP6, T3 und T7 RNA-Polymerase
VWR, Darmstadt	Kaisers Glyceringelatine, KODAK® BioMax® Maximum Resolution (MR) Autoradiography Film (Röntgenfilm)

Whatman Int. Ltd., Maidstone, England	Whatman 3MM Filterpapier
Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Garbsen	Ketamin (100 mg/ml)
Zymed Inc., San Francisco, USA	BCIP/NBT Substrate Kit

4.2 Geräte und Software

4.2.1 Geräte

Autoklaven:

Tuttnauer/Systec, Wettenberg	Autoklav 2540 EK
------------------------------	------------------

Blotapparaturen:

Bio-Rad Laboratories GmbH, München	Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell
------------------------------------	---------------------------------------

Brutschränke:

Heraeus, Hanau	Begasungsbrutschrank BB6220, CO ₂ -Inkubator HeraCell 240, Zellinkubator CO ₂ -Auto Zero
Eppendorf AG, Hamburg	New Brunswick Galaxy 48 R CO ₂ Inkubator

Gelelektrophorese-Apparaturen:

Bio-Rad Laboratories GmbH, München	Wide Mini Sub® Cell GT
Eastman Kodak, Rochester, USA	IBI Variable Comb Vertical Gel Electrophoresis Unit

Heiz- und Kühlblöcke:

Eppendorf AG, Hamburg	Thermomixer 5436, Thermomixer compact
BIOER, Hangzhou, P.R.China	MB-102, HB-202

Mikroskope:

Carl Zeiss, Jena	Axiovert 10, Axiovert 200 mit AxioCam MRc
Leica Camera AG, Solms	Inverses Mikroskop Leica DM IL

Spannungsgeräte:

Bio-Rad Laboratories GmbH, München	PowerPac Basic, PowerPac HC, Modell 200/2.0 power supply, Consort E455
GE Healthcare Life Science, Freiburg	Electrophoresis Power Supply 301 und 1001

Sterilwerkbänke:

Heraeus, Hanau	HLB 2448 6s, HeraSafe KS18, LaminAir HB 2448
----------------	--

Thermocycler:

MJ Research, Waltham, USA	Peltier Thermal Cycler PTC-200
Roche Diagnostics, Mannheim	LightCycler® II, LightCycler® 480

Waagen:

Sartorius, Göttingen R160P, L2200S

Zentrifugen:

Eppendorf, Hamburg MiniSpin Plus, Centrifuge 5810R, 5415C, 5415D, 5415R

Heraeus, Hanau Biofuge 22R, Megafuge 1.0

Hettich Laborapparate AG, Bäch Rotina 380 R

Kisker, Steinfurt Tischzentrifuge

Sonstige Geräte:

Bachhofer, Reutlingen UV-Transilluminator IL 250 K, 254 nm

Berthold Technologies, München Geiger-Zähler LB124, Lumat LB 9507

Biometra GmbH, Göttingen Tumbling Table WT17

BMG LABTECH GmbH, Ortenberg FLUOstar Omega

Bühler, Edmund, Tübingen Schüttler SM25

Eastman Kodak, Rochester, USA Entwicklertasche X-Omat 2000 Processor

Heidolph, Kehlheim Magnetrührer MR 2000, MR 2002, Vortexer REAX 2000

Hoefer, Inc., Holliston, USA Vakuumgeltrockner Slab Gel Dryer GD 2000

IKA-Labortechnik, Staufen Schüttler IKA-Vibrax VXR

Merck KGaA, Darmstadt Wasserfilteranlage Milli-QUF Plus

MWG Biotech, Ebersberg ELISA-Reader Emax, Geldokumentationssystem 2001

Peqlab GmbH, Erlangen Nanodrop® 2000 UV/Vis Spectrophotometer

Savant, New York, USA Speedvac Concentrator SC 110

WTW, Weilheim pH-Meter pH522

4.2.2 Software

Carl Zeiss, München AxioVs40 V 4.5.0.0

Genomatix Software GmbH, München MatInspector/MatBase

GraphPad Software Inc., San Diego, USA GraphPad Prism 5.04 Software

<http://ecrbrowser.dcode.org/> ECR-Brower

<http://technelysium.com.au/> Chromas Lite 2.1.1

<http://rsbweb.nih.gov/ij/> ImageJ

4.3 Organismen

4.3.1 Bakterien

Epicurian® coli XL2-Blue MRF' (Aligent Technologies, Santa Clara, USA)

XL1-Blue *Escherichia coli* Zellen (enthalten in QuickChange™ II Mutagenesis Kit)

NEB 10-beta *competent E.coli* (High Efficiency) (New England Biolabs, Ipswich, USA)

4.3.2 Säugetiere

Heterozygote AP-2 ϵ defiziente Mäuse (*Tfap2e* +/-) wurden von Herrn Dr. M. Moser (Max Planck Institut für Biochemie, München) zur Verfügung gestellt. Aus diesen wurde über Verpaarung eine homozygote *Tfap2e* -/- sowie eine korrelierende WT Mauslinie erstellt. Die Tiere wurden über homologe Rekombination eines *Neomycin*-Konstrukts mit einem internen Stopp-Codon in das murine *Tfap2e*-Gen generiert. Die Insertion befindet sich zwischen einer ApaII und NotI Schnittstelle in Exon 2 von *Tfap2e*, so dass bei der Translation nur ein inaktives Teilfragment des AP-2 ϵ Proteins synthetisiert werden kann. Zu beachten ist, dass die in den *Tfap2e* -/- Mäusen gebildete AP-2 ϵ mRNA, mit Ausnahme der durch die homologe Rekombination ausgetauschten Nukleotide, mit der aus WT Mäusen identisch ist. Um dies bei Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene zu berücksichtigen, wurde für diese Arbeit ein Primerpaar (4.6.2) erstellt, das zwischen den beiden Restriktionsschnittstellen an die AP-2 ϵ cDNA bindet (mAP-2 ϵ _388for / mAP-2 ϵ _542rev). Da die Primer nicht mit der veränderten AP-2 ϵ cDNA aus *Tfap2e* -/- Mäusen interagieren können, wird nur mit Proben aus WT Mäusen ein spezifisches PCR-Produkt generiert (Abb. 4.1).

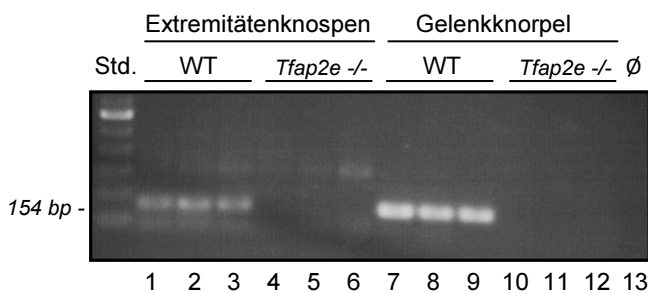


Abb. 4.1: Unterscheidung zwischen WT und *Tfap2e* -/- Mäusen auf mRNA-Ebene

Nach einer qRT-PCR mit cDNA aus den mesenchymalen Zellen embryonaler Extremitätenknospen (E11,5) bzw. Chondrozyten aus adultem Kniegelenkknorpel (ca. 10 w) wurden die Produkte über eine Gelelektrophorese aufgetrennt. Bei der Reaktion mit cDNA aus WT Mäusen (1-3 und 7-9) entstand ein spezifisches 154 bp Produkt, wohingegen mit cDNA aus AP-2 ϵ -defizienten Mäusen (4-6 und 10-12) nur unspezifische bzw. keine Banden sichtbar waren. Bei der Negativkontrolle (13) ohne cDNA-template wurde kein DNA Fragment amplifiziert.

4.4 Zellen und Gewebeproben

Chondrozytäre Zelllinien: SW1353 und C-28/I2

In dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien als Modellsysteme für Knorpelzellen verwendet.

SW1353: Humane Chondrosarkomzelllinie (ATCC-Nr.: HTB-94). Die Zellen haben einen chondrozytären Phänotyp und exprimieren die für Knorpelzellen charakteristischen Gene *COL2A1*, *MIA/CD-RAP*, *ACAN* (*aggrecan*) sowie *TFAP2E* (Wenke *et al.*, 2006).

C-28/I2: Immortalisierte humane Chondrozytenzelllinie (zur Verfügung gestellt von Frau Dr. M.B. Goldring, Hospital for Special Surgery, New York, USA).

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)

hMSC wurden von Mitarbeitern der Abteilung für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg isoliert und für Experimente zur Verfügung gestellt. Quelle waren Darmbeine von Patienten, bei denen eine Spondylodese (Wirbelkörperverblockung) durchgeführt wurde.

Murine mesenchymale Stammzellen (mMSC) und murine

mMSC wurden eigenhändig aus den Ober- und Unterschenkelknochen von WT und *Tfap2e*^{-/-} Mäusen isoliert (5.6.6).

Murine Gewebeproben und Embryonen

Alle murinen Gewebeproben und Embryonen wurden eigenhändig aus den im Labor gezüchteten WT und *Tfap2e*^{-/-} Mäusen isoliert (5.6.4).

4.5 Plasmide

4.5.1 Plasmide für Promotoranalysen

4.5.1.1 pGL2-/pGL3-Basic und pGL3-Promoter

Der pGL2-Basic bzw. pGL3-Basic Vektor enthält die kodierende Region für das *Luziferase* Gen der Feuerfliege (*Photinus pyralis*). Zur Analyse von putativen Promotorregionen können diese mittels einer multiplen Klonierungsstelle vor das *Luziferase*-Gen integriert werden. Der pGL3-Promoter Vektor beinhaltet zusätzlich eine SV40 Promotorsequenz, welche zu einer starken, konstitutiven Expression des nachgeschalteten *Luziferase* Gens führt. Dadurch kann der Einfluss von Enhancer- oder Repressor-Sequenzen, welche zu einer Modulation der Aktivität des SV40 Promotors führen, analysiert werden.

4.5.1.2 pRL-TK

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz bei der Durchführung von Luziferase Assays (5.5.4) wurde der pRL-TK Vektor zusammen mit dem eigentlichen Reporter-Plasmid kotransfiziert. Er enthält ein modifiziertes *Luziferase*-Gen, welches aus der Oktokoralle *Renilla reniformis* stammt und der Kontrolle eines HSV-TK (*herpes simplex thymidine kinase*) Promotors obliegt.

4.5.1.3 6xHRE Reportergenkonstrukt

Zur Kontrolle von Experimenten, in denen die Aktivität des O₂-abhängigen Transkriptionsfaktorkomplexes HIF-1 moduliert wurde, wurde ein Reportergenkonstrukt mit sechs aufeinanderfolgenden HRE Motiven des humanen Phosphoglycerat-Kinase Promotors in einem pGL2-Basic Vektor verwendet. Das Plasmid wurde von Frau Dr. C. Warnecke (Universitätsklinikum Erlangen, Abteilung für Nephrologie und Hypertensiologie) zur Verfügung gestellt.

4.5.1.4 COL2A1 und CXCL1 Promotor Reportergenkonstrukte

Für die Analyse des humanen *COL2A1* Promotors wurde ein Reportergenkonstrukt von Frau Dr. L. J. Sandell (Washington University School of Medicine, St. Louis, USA) bereitgestellt. Putative AP-2 Bindestellen wurden durch Nukleotidaustausch (5.2.7) mutiert. Die nachfolgenden Zahlenangaben (in bp) beziehen sich auf den Transkriptionsstart von *COL2A1*.

Für die *CXCL1* Promotor Analyse wurden Reportergenkonstrukte mit unterschiedlich langen Fragmenten des humanen *CXCL1* Promotors kloniert und putative AP-2 Motive über Mutagenese (5.2.7) verändert. Die Zahlenangaben (in bp) beziehen sich auf den Translationsstart.

Plasmid	Beschreibung
pCOL2A1prom	pGL2-Basic mit der Region von -577 bis +125 des <i>COL2A1</i> Promotors.
pCOL2A1prom_ AP-2.1*	pCOL2A1prom, wobei innerhalb der putativen AP-2 Bindestelle AP-2.1 (-317 bis -309) drei Nukleotide ausgetauscht wurden (G-317T; C-315T; G-314A).
pCOL2A1prom_ AP-2.2*	pCOL2A1prom, wobei innerhalb der putativen AP-2 Bindestelle AP-2.2 (-221 bis -212) drei Nukleotide ausgetauscht wurden (G-221A; C-220G; C-219T).
pCOL2A1prom_ AP-2.3*	pCOL2A1prom, wobei innerhalb der putativen AP-2 Bindestelle AP-2.3 (-135 bis -128) zwei Nukleotide ausgetauscht wurden (C-135A; C-134T).
pCXCL1prom128	pGL3-Basic mit der Region von -128 bis -17 des <i>CXCL1</i> Promotors.
pCXCL1prom299	pGL3-Basic mit der Region von -299 bis -17 des <i>CXCL1</i> Promotors.
pCXCL1prom1448	pGL3-Basic mit der Region von -1448 bis -17 des <i>CXCL1</i> Promotors.
pCXCL1enh	pGL3-Promoter mit der Region von -1448 bis -1213 des <i>CXCL1</i> Promotors.

pCXCL1prom299_ AP-2.2*	pCXCL1prom299, wobei innerhalb der putativen AP-2 Bindestelle AP-2.2 (-144 bis -136) zwei Nukleotide ausgetauscht wurden (C-143T; C-142A).
pCXCL1prom1448_ AP-2.1*	pCXCL1prom1448, wobei innerhalb der putativen AP-2 Bindestelle AP-2.1 (-1398 bis -1390) zwei Nukleotide ausgetauscht wurden (G-1391C; G-1390A).
pCXCL1prom1448_ AP-2.2*	pCXCL1prom1448, wobei innerhalb der putativen AP-2 Bindestelle AP-2.2 (-144 bis -136) zwei Nukleotide ausgetauscht wurden (C-143T; C-142A).
pCXCL1prom1448_ AP-2.1*/2.2*	pCXCL1prom1448, wobei in beiden putativen AP-2 Bindestellen (AP-2.1 und AP-2.2) die beschriebenen Mutationen durchgeführt wurden.

4.5.2 AP-2 Expressionsplasmide

Expressionsplasmide für AP-2 α , β und ϵ wurden von Herrn Dr. Moser zur Verfügung gestellt. Dafür wurden die kodierenden Sequenzen (CDS, engl. *coding DNA sequence*) der humanen AP-2 Gene (*TFAP2A*, *TFAP2B* und *TFAP2E*) in pCMX-PL1 Vektoren unter der Kontrolle eines CMV (*cytomegalovirus*) Promotors kloniert.

4.5.3 Plasmide zur Herstellung von RNA-Sonden für *in situ* Hybridisierungen

Folgende Plasmide wurden zur Herstellung von einzelsträngigen RNA-Sonden für *in situ* Hybridisierungen (5.2.13) verwendet und von Herrn Prof. Dr. K. von der Mark (Universität Erlangen-Nürnberg, Experimentelle Medizin I) zur Verfügung gestellt (Schmidl *et al.*, 2006). Nach Linearisierung der Plasmide mittels Restriktionsverdau (5.2.5) können über eine *in vitro* Transkription mit entsprechenden RNA-Polymerasen (5.2.13.1) RNA-Sonden generiert werden, deren Basenabfolge entweder komplementär (*antisense*) oder identisch (*sense*) zu der durch das Gen kodierten mRNA ist.

Ziel-mRNA	Spezies	Restriktionsenzym	RNA-Polymerase	Orientierung
Col2a1	murin	HindIII	T7	<i>sense</i>
		EcoRI	T3	<i>antisense</i>
Col10a1	murin	XbaI	Sp6	<i>sense</i>
		BamHI	T7	<i>antisense</i>

4.6 Oligonukleotide und siRNAs

Nach Lösen in ddH₂O wurden Oligonukleotide als 100 μ M Stammlösungen bei -20°C gelagert. Für alle Experimente wurden diese Stammlösungen nochmals 1:5 mit ddH₂O auf eine finale Konzentration von 20 μ M verdünnt. Von siRNAs (engl. *small interfering RNAs*) wurde eine 20 μ M Stammlösung durch Lösen in RNase-freiem ddH₂O erstellt und bei -20°C gelagert.

4.6.1 Oligonukleotide für Klonierungen und Mutagenese-PCR

Die folgenden Oligonukleotide wurden zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR verwendet, die anschließend in Plasmide kloniert wurden. Restriktionsenzym-Schnittstellen sind unterstrichen. Außerdem sind Oligonukleotide für die Mutagenese PCR (5.2.7) angegeben. Nukleotide, die bei der Reaktion ausgetauscht wurden, sind grau hinterlegt.

Primer	Sequenz (5'-3')	Beschreibung
<i>Col2A1</i> prom_AP-2.1 mut_for/rev	CTCCGAGGGGAGGGTCTAGAGGCCACCCCTTCC GGAAGGGTGGCCTCTAGACCCTCCCCTCGGAG	Mutageneseprimer für die Bindestelle AP-2.1 im <i>COL2A1</i> Promotor.
<i>Col2A1</i> prom_AP-2.2 mut_for/rev	CCCCGCCCGATCAGAGTACTCGGCGCACTAGGG CCCTAGTGCGCCGAGTACTCTGATCGGGCGGGG	Mutageneseprimer für die Bindestelle AP-2.2 im <i>COL2A1</i> Promotor.
<i>Col2A1</i> prom_AP-2.3 mut_for/rev	GGGCACTGGCAGGATCCAGGCGGGCTCC GGAGCCCGCCTGGATCCTGCCAGTGCCC	Mutageneseprimer für die Bindestelle AP-2.3 im <i>COL2A1</i> Promotor.
<i>CXCL1</i> prom128_for	GACGCTAGCCTTTCCGCCCAACCATG	Forward Primer für p <i>CXCL1</i> prom128.
<i>CXCL1</i> prom299_for	GACGCTAGCCTCAGAGTCCACAGGAGTTAC	Forward Primer für p <i>CXCL1</i> prom299.
<i>CXCL1</i> prom1213_rev	GACAGATCTAATTTTCAGTCATTTAACCTGGTAGC	Reverse Primer für p <i>CXCL1</i> enh.
<i>CXCL1</i> prom1448_for	GACGCTAGCGGTCTTACTATTGAGCTGGGC	Forward Primer für p <i>CXCL1</i> enh und p <i>CXCL1</i> prom1448.
<i>CXCL1</i> prom_rev2	GACAAGCTTGTCTGGCGGTGTGAGAGGAG	Reverse Primer für p <i>CXCL1</i> prom128, 299 und 1448.
<i>CXCL1</i> prom_AP-2.1 mut_for/rev	GAGACATCTGCCCCTGCAGCAGAAGCCTCTG CAGAGGCTTCTGCTGCAGGGGCAGATGTCTC	Mutageneseprimer für die Bindestelle AP-2.1 im <i>CXCL1</i> Promotor.
<i>CXCL1</i> prom_AP-2.2 mut_for/rev	GGAATTTCCCTGGTACGGGGGCTCCGGG CCCGGAGCCCCCGTACCAGGGAATTCC	Mutageneseprimer für die Bindestelle AP-2.2 im <i>CXCL1</i> Promotor.

4.6.2 Oligonukleotide für quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Die folgenden Primerpaare wurden für Genexpressionsanalysen mittels qRT-PCR (5.2.10) eingesetzt. Alle Primer wurden so entworfen, dass standardmäßig eine Annealing-Temperatur von 60°C gewählt werden konnte. Eine Ausnahme hierzu bilden die murinen *Tfap2e* Primer, bei denen die Annealing-Temperatur zur Erhöhung der Spezifität auf 65°C angehoben wurde.

Gen	Spezies	Primer	Produkt	Sequenz (5'-3')
<i>ACTB</i>	human	hβ-Act_735for hβ-Act_1119rev	384 bp	CTACGTCGCCCTGGACTTCGAGC GATGGAGCCGCCGATCCACACGG
<i>Actb</i>	murin	mβ-Act_885for mβ-Act_1233rev	348 bp	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG
<i>GAPDH</i>	human	hGAPDH_777for hGAPDH_1045rev	268 bp	GGCTCTCCAGAACATCATCCCTGC GGGTGTCGCTGTTGAAGTCAGAGG

MATERIAL

<i>Acan</i>	murin	mAggrecan_1922for mAggrecan_2128rev	206 bp	CAGTTCACCTTCCAGGAAG GTAGAGGTAGACCGTTCTCACG
<i>ANGPTL4</i>	human	hAngptl4_180for hAngptl4_354rev	174 bp	CAGGGTACCTAAGAGGATGAGCGGTG CTGCTCGAGCTGCAGGAGTCCGTGC
<i>Angptl4</i>	murin	mAngptl4_1036for mAngptl4_1304rev	268 bp	GATGGCAATGCCAAATTGCTCC TGCCGTGGGATAGAGTGAAG
<i>COL2A1</i>	human	hCol2_4452for hCol2_4749rev	297 bp	AGGGCAATAGCAGGTTACAG GGTCAGGTGAGCCATTACAGT
<i>Col2a1</i>	murin	mColl2_2657for mColl2_2918rev	261 bp	CTACTGGAGTGACTGGTCTTAAGG GGACCATCATCTCCAGGTTCTCC
<i>COL10A1</i>	human	hCol10_374for hCol10_759rev	385 bp	AGCCAGGGTTGCCAGGACCA TTTTCCCACTCCAGGAGGGC
<i>Col10a1</i>	murin	mCol10_38for mCol10_325rev	287 bp	CTGCCCCACGCATCTCCAG GCTTGCTGCGGTCTCTGAG
<i>CXCL1</i>	human	hCXCL1_for239 hCXCL1_rev400	161 bp	CCCAAGAACATCCAAAGTGTG GTTGGATTTGTACTGTTTCAGC
<i>HIF1A</i>	human	hHif1α_866for hHif1α_1031rev	165 bp	CACAGGCCACATTCACGTA ATCCAGGCTGTGTCGACTG
<i>Il1b</i>	murin	mIL-1b_366for mIL-1b_582rev	216 bp	GAGCCCATCTCTGTGACTCA TGTCGTTGCTTGGTTCTCCTTG
<i>MIA/CD-RAP</i>	human	hMia_220for hMia_544rev	324 bp	CATGCATGCGGTCTATGCCAAGCTG GATAAGCTTTCACTGGCAGTAGAAATC
<i>MIA/CD-RAP</i>	murin	mMia_184for mMia_391rev	207 bp	CCAAGCTGGCTGACTGGAAG GCCAGGTCTCCATAGTAACC
<i>Mmp1a/Mmp1b</i>	murin	mMMP1_17for mMMP1_192rev	175 bp	CTGTTGCTTCTCTGGGCTGC CTGCATTTGCCTCAGCTTTTC
<i>Mmp3</i>	murin	mMMP3_362for mMMP3_466rev	104 bp	GTTCTGATGTTGGTGGCTTCAG CTGTCTTGGAATCCGGTGTA
<i>Mmp13</i>	murin	mMMP13_899for mMMP13_979rev	80 bp	CCCAGCCCTATCCCTTGATGCCA TGCAGGCGCCAGAAGATCTGT
<i>SOX9</i>	human	hSox9_1552for hSox9_1774rev	222 bp	CGAACGCACATCAAGACGA AGGTGAAGGTGGAGTAGAGGC
<i>TFAP2E</i>	human	hAP-2ε_1690for hAP-2ε_1958rev	268 bp	GGAGTAAGGGAGGGTGGCCTCTC GGGTGTCGCTGTTGAAGTCAGAG
<i>Tfap2e</i>	murin	mAP-2ε_388for mAP-2ε_542rev	154 bp	CACTGTGTCACACTCCCGCCG CGCTAGGCCCGCTAGGGGTC
<i>Timp1</i>	murin	mTIMP1_147for mTIMP1_417rev	270 bp	AGACACACCAGAGCAGATACC CCGGATATCTGCGGCATTTTC
<i>Timp2</i>	murin	mTIMP2_442for mTIMP2_722rev	280 bp	GCAGACGTAGTGATCAGAGCC TCCCAGGGCACAATGAAGTC
<i>Timp3</i>	murin	mTIMP3_255for mTIMP3_570rev	315 bp	GACCCTTGGCCACTTAGTCC CGGATCACGATGTCGGAGTTG
<i>Tnf</i>	murin	mTNFα_for498 mTNFα_rev636	138 bp	CCTCCTGGCCAACGGCATGG TCGGCTGACGGTGTGGGTGA

4.6.3 Oligonukleotide für Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Primer	Produkt	Sequenz (5'-3')	Amplifizierte Region
COL2A1_ChIP_for3 COL2A1_ChIP_rev3	212 bp	CTCCGCTGCTCCTTTCTACC CGCAGAGATGGCCCCCTGC	Region um AP-2.1 im COL2A1 Promotor.
COL2A1_ChIP_for5 COL2A1_ChIP_rev6	101 bp	GCAGCCCCGGGTTTGGG CTCTCTGGGAGTCACGCTTC	Region um AP-2.2 im COL2A1 Promotor.
COL2A1_ChIP_for2 COL2A1_ChIP_rev2	107 bp	GAAGCGTGACTCCCAGAGAG CCCGCTGGGCTGTAACCTG	Region um AP-2.3 im COL2A1 Promotor.
CXCL1_prom2_for2 CXCL1_prom2_rev2	145 bp	CCCAAGCGCTCCACCCTG CTCTCCGAGATCCGCGAAC	Region um AP-2.2 im CXCL1 Promotor.

4.6.4 Oligonukleotide für EMSA

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Beschreibung
CXCL1_EMSA_2.2_for CXCL1_EMSA_2.2_rev	AATTTCCCTGGCCCCGGGGCTCCGGGCTT AAGCCCGGAGCCCCCGGGCCAGGGAATT	Für ein dsDNA-Fragment um AP-2.2 im CXCL1 Promotor.
COL2A1_EMSA_2.3_for COL2A1_EMSA_2.3_rev	GGCAGGGCCCAGGCGGGCTC GAGCCCGCCTGGGCCCTGCC	Für ein dsDNA-Fragment um AP-2.3 im COL2A1 Promotor.

4.6.5 Oligonukleotide für die Genotypisierung von *Tfap2e* -/- Mäusen

Primer	Sequenz (5'-3')
mAP-2ε gen anti2	CTACGTCGCCCTGGACTTCGAGC
mAP-2ε gen sense2	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC
pGK polyA down	GGCTCTCCAGAACATCATCCCTGC

Die Primer-Sequenzen wurden von Herrn Dr. M. Moser zur Verfügung gestellt.

4.6.6 siRNAs

Als Negativkontrolle bei siRNA-Transfektionen diene eine unspezifische Kontroll siRNA (si_Kont.) mit der Zielsequenz: 5'-AATTCTCCGAACGTGTCACGT-3'.

Zielgen	siRNA	Spezies	Zielsequenz (5'-3')	Transfektion
HIF1A	Hs_HIF1A_5 Hs_HIF1A_6	human	AGGAAGAACTATGAACATAAA AGCCATTTACATAATATAGAA	Lipofectamine® 2000 Lipofectamine® 2000
TFAP2E	Hs_TFAP2E_8	human	TGGTGGTGTGTTGGTAAGTTA	Lipofectamine® RNAiMAX

4.7 Antikörper

Primäre Antikörper

gegen	aus Spezies	Beschreibung
AP-2ε (human + murin)	Kaninchen	Primäres polyklonales anti-AP-2ε Antiserum für ChIP, EMSA und WB (1:400 in TBST inkl. 5 % Milchpulver). Zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. M. Moser (Wang <i>et al.</i> , 2004).
β-Aktin (human + murin)	Maus	Primärer monoklonaler anti-β-Aktin Antikörper für WB (1:5000 in PBS). Von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München.
Cleaved Caspase 3 (human + murin)	Kaninchen	Primärer anti-Cleaved Caspase 3 Antikörper für immunhistochemische Färbungen (1:50). Von Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA.
Digoxigenin	Schaf	anti-Digoxigenin-AP Fab fragments. Antigen-bindende Fragmente von IgG Antikörpern gegen Digoxigenin zur Detektion DIG-markierter RNA-Sonden bei <i>in situ</i> Hybridisierungen (1:5000). AP-konjugiert. Von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim.
HIF-1α (human + murin)	Kaninchen	Primärer anti-HIF-1α Antikörper für WB (1:500 in TBS inkl. 5 % Milchpulver). Von Novus Biologicals, Littleton, USA.

Sekundäre Antikörper

α-Kaninchen HRP	Sekundärer IgG Antikörper für immunhistochemische Färbungen (1:50). Histofine Simple Stain MAX PO (R) von Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan.
α-Kaninchen AP	Sekundärer IgG Antikörper für WB (1:1000). AP-konjugiert. Von Merck KGaA, Darmstadt.
α-Maus AP	Sekundärer IgG Antikörper für WB (1:3000). AP-konjugiert. Von Merck KGaA, Darmstadt.

4.8 Medien, Antibiotika, Puffer und Lösungen

Falls nicht anderweitig vermerkt, wurden Medien bei 4°C und Lösungen bzw. Puffer bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

4.8.1 Medien für Bakterien und Säugetierzellen

Lysogeny Broth (LB) Medium	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l
[autoklavieren; Lagerung bei RT]		

Für die Herstellung von festen LB-Platten wurden zusätzlich 15 g/l Agar zugegeben. Zur Selektion auf Ampicillinresistenz wurde 100 µg/ml Ampicillin beigelegt.

MATERIAL

Super Optimal Broth (SOC)	New England Biolabs, Ipswich, USA	
DMEM high glucose (4,5 g/l)	Zusätze pro 500 ml Medium:	
	FKS	50 ml
	Penicillin/Streptomycin-Lösung (100x)	5 ml
<i>Micromass</i> -Medium	DMEM/Ham's F12 (1:1)	
	Zusätze pro 50 ml Medium:	
	FKS	5 ml
	Penicillin/Streptomycin-Lösung (100x)	1 ml
	Ascorbinsäure-2-Phosphat (100 mM)	125 µl
	β-Glycerolphosphat (100 mM)	500 µl
hMSC-Differenzierungsmedium	DMEM high glucose (4,5 g/l)	
	Zusätze pro 50 ml Medium:	
	Natriumpyruvat (100 mM)	500 µl
	Ascorbinsäure-2-Phosphat (100 mM)	85 µl
	Dexamethason (1 mM)	5 µl
	ITS TM Premix (100 x)	500 µl
	TGF-β3	10 ng/ml
mMSC-Kultivierungsmedium	DMEM high glucose (4,5 g/l)	
	Zusätze pro 500 ml Medium:	
	FKS	100 ml
	Penicillin/Streptomycin-Lösung (100x)	5 ml
	Amphotericin B-Lösung	1 ml
	Vitamin-Mix	1 ml
Einfriermedium	DMEM high glucose	22,5 ml
	FKS	17,5 ml
	DMSO	10 ml
	[Lagerung bei -20°C]	

4.8.2 Antibiotika und Antimykotika

Ampicillin-Stammlösung	50 mg/ml in ddH ₂ O (-20°C)
Amphotericin B-Stammlösung	250 µg/ml (-20°C)
Penicillin/Streptomycin-Lösung (100x)	10.000 U/ml bzw. 10 mg/ml (-20°C)

4.8.3 Puffer und Lösungen

4.8.3.1 Lösungen für die Isolierung von Plasmiden aus *E.coli* (Mini-Präparation)

Lösung I	Glukose	20 mM
	Tris/HCl pH 8,0	25 mM
	EDTA	10 mM
	[Lagerung bei 4°C]	
Lösung II	NaOH	0,2 M
	SDS	1 %
Lösung III	KOAc (5M)	20 ml
	Eisessig	3,8 ml
	H ₂ O	9,5 ml

4.8.3.2 Puffer, Lösungen und Gele für die Agarose-Gelelektrophorese

TAE (50x)	Tris/Acetat pH 8,0	2 M
	EDTA	50 mM
Agarosegele	Agarose	1-1,5 % (w/v)
	[gelöst in TAE (1x); aufkochen]	
DNA-Auftragspuffer (10x)	Saccharose	40 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Xylencyanol	0,25 % (w/v)
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid in ddH ₂ O	0,04 % (w/v)

4.8.3.3 Puffer zur Herstellung von Gesamtprotein-Extrakten (RIPA)

RIPA Puffer	Tris/HCl pH 7,5	50 mM
	NaCl	150 mM
	Nonidet® P-40	1 % (w/v)
	Natriumdesoxycholat	0,5 % (w/v)
	SDS	0,1 % (w/v)
	Protease Inhibitoren	1 Tablette/10 ml
	[Lagerung bei -20°C]	

MATERIAL

HIF RIPA Puffer	Harnstoff	6,65 M
	Glycerin	10 % (w/v)
	SDS	1 % (w/v)
	Tris pH 6,8	10 mM
	DTT	5 mM
	Protease Inhibitoren	1 Tablette/10 ml
	[pH 7,4; Lagerung bei -20°C]	

4.8.3.4 Puffer und Gele für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Laufpuffer für SDS-PAGE	Tris/HCl pH 8,5	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
Trenngel (12,5 bzw. 8,75 %)	Acrylamid (40 %)	3,125 / 2,2 ml
	Tris/HCl pH 8,8 (1 M)	3,75 ml
	SDS (10 %)	100 µl
	APS (10 %)	50 µl
	TEMED	10 µl
	ddH ₂ O	3,0 / 3,9 ml
Sammelgel (4 %)	Acrylamid (40 %)	375 µl
	Tris/HCl pH 6,8 (1 M)	450 µl
	SDS (10 %)	37,5 µl
	APS (10 %)	25 µl
	TEMED	3,5 µl
	ddH ₂ O	2,85 ml

4.8.3.5 Puffer und Lösungen für die Western Blot Analyse

Transferpuffer	Methanol	10 % (v/v)
	Tris/HCl pH 8,5	25 mM
	Glycin	190 mM
TBS	Tris/HCl pH 7,6	50 mM
	NaCl	150 mM

MATERIAL

TBS-T	TBS	
	Tween20	0,1 % (v/v)
Blockierungslösung	TBS-T bzw. TBS	
	Milchpulver	4 % (w/v)

4.8.3.6 Puffer für die Isolierung von Kernproteinen

Puffer I	Hepes pH 7,9	10 mM
	KCl	10 mM
	EDTA	0,1 mM
	EGTA	0,1 mM
	DTT	1 mM
Puffer II	Hepes pH 7,9	20 mM
	NaCl	0,4 M
	EDTA	1 mM
	EGTA	1 mM
	DTT	1 mM

4.8.3.7 Puffer und Gele für EMSAs

Natives Polyacrylamidgel (4,8 %)	Acrylamid (30 %)	12 ml
	10x TBE	1,5 ml
	APS (10 %)	300 µl
	TEMED	75 µl
	[ddH ₂ O ad. 75 ml]	
5x EMSA-Bindepuffer	Hepes, pH 7,9	25 mM
	MgCl ₂	25 mM
	KCl	250 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	25 mM
	Glyzerin	50 %
	[Lagerung bei -20°C]	

MATERIAL

EMSA-Ladepuffer	Formamid	80 %
	NaOH	10 mM
	EDTA	1 mM
	Xylencyanol	0,1 %
	Bromphenolblau	0,1 %
	Glyzerin	50 %
	[Lagerung bei -20°C]	
10x TBE	Tris/HCl	900 mM
	Borsäure	900 mM
	EDTA	20 mM

4.8.3.8 Lösungen und Puffer für *in situ* Hybridisierungen

Gefäße und Laborbesteck, welche für das Ansetzen der Puffer und Lösungen für die *in situ* Hybridisierung benötigt wurden, wurden vor ihrem Einsatz zur Denaturierung exogener RNasen sterilisiert (4 h bei 200°C). DEPC-H₂O und ddH₂O wurden vor ihrem Einsatz autoklaviert.

Färbelösung	BM-Purple	20 ml
	Levamisol-Hydrochlorid (200 mM)	200 µl
	Tween20	20 µl
	[frisch ansetzen; 2 min zentrifugieren bei 15.000 g und den Überstand verwenden]	
Hybridisierungslösung	Formamid	58,75 %
	NaCl (5 M)	18,75 %
	PE (10x)	12,5 %
	BSA (10 %)	1,25 %
	SDS (20 %)	6,25 %
	Heparin (5 %)	1,25 %
	t-RNA (10 mg/ml)	1,25 %
MAB (10x)	Maleinsäure	116 g
	NaCl	88 g
	[DEPC-H ₂ O ad. 1 l; pH 7,5 ; autoklavieren]	
MABT	MAB (1x)	
	Tween20	0,1 %

MATERIAL

NTM-Puffer	NaCl	100 mM
	Tris/HCl pH 9,5	100 mM
	MgCl ₂	50 mM
NTE-Puffer	NaCl	0,5 M
	Tris/HCl pH 7,0	10 mM
	EDTA pH 8,0	5 mM
Paraformaldehyd (4 %) in PBS	Paraformaldehyd	40 g
	ddH ₂ O	800 ml
	PBS (10x)	100 ml
	[ddH ₂ O ad. 1 l; Lagerung bei -20°C]	
PBS (10x)	NaCl	80 g
	Na ₂ HPO ₄	11,6 g
	KH ₂ PO ₄	2 g
	KCl	2 g
	[DEPC-H ₂ O ad. 1 l; pH 7,4; autoklavieren]	
PE-Puffer (10x)	PIPES pH 6,8	100 mM
	EDTA pH 8,0	10 mM
Proteinase K-Puffer	Tris/HCl pH 7,2	20 mM
	EDTA pH 8,0	1 mM
	[autoklavieren]	
SSC-Puffer (5x)	NaCl	43,8 g
	Na(dihydrogen)Citrat	22,1 g
	[DEPC-H ₂ O ad. 1 l; pH 7,0; autoklavieren]	
TBST	NaCl	8 g
	KCl	0,2 g
	Tris/HCl pH 7,5 (1 M)	2,5 ml
	Tween20	0,1 %
	[ddH ₂ O ad. 1 l]	
Tris/Glycin-Puffer	Tris Base	12,1 g
	Glycin	7,5 g
	[ddH ₂ O ad. 1 l; autoklavieren]	

4.8.3.9 Sonstige Lösungen und Puffer

Kahle`s Fixans	EtOH	28,9 %
	Formaldehyd	0,37 %
	Eisessig	3,9 %
PBS (10x, für Zellkultur)	PAA Laboratories Inc., Dartmouth, USA	
PBS (10x, für unsterile Arbeiten)	NaCl	80 g
	Na ₂ HPO ₄	11,6 g
	KH ₂ PO ₄	2 g
	KCl	2 g
	[ddH ₂ O ad. 1 l; pH 7,4]	
RNase A Lösung	Tris/HCl pH 7,0	10 mM
	RNase A	10 mg/ml

5 Methoden

Sämtliche molekularbiologischen Arbeiten sowie Experimente mit Bakterien und Säugerzellen wurden in sterilen Gefäßen und mit sterilen Lösungen durchgeführt. Alle Zellkulturarbeiten fanden zusätzlich unter einer Sterilwerkbank statt. Soweit nicht anderweitig angegeben, wurden alle Arbeitsschritte bei Raumtemperatur (RT) ausgeführt.

5.1 Arbeiten mit Bakterien

Zur Retransformation und Amplifikation von Plasmiden fand der Bakterienstamm Epicurian® *coli* XL2-Blue Verwendung. Für die Transformation von Ligationsansätzen (5.2.6) wurde der Bakterienstamm NEB 10-beta benutzt. Für die Transformation von Plasmiden bei Mutagenese Experimenten (5.2.7) wurden XL1-Blue *Escherichia coli* Zellen verwendet. Bei den folgenden Versuchsbeschreibungen wird nicht weiter zwischen den einzelnen Stämmen unterschieden.

5.1.1 Kultivierung von Bakterien

Bakterienzellen wurden nach einer Transformation (5.1.2) sowohl auf festen LB-Nährböden als auch in LB-Flüssigmedium (4.8.1) kultiviert. Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide trugen ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Ampicillin (β -Lactamase). Um Zellen mit einem aufgenommenen Plasmid zu selektionieren, wurde dem Nährmedium deshalb jeweils 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank und die der Flüssigkulturen bei 37°C und 250 Upm in einem Schüttler.

5.1.2 Transformation von Bakterien

Pro Transformationsansatz wurden 100 µl chemisch kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 100 ng Plasmid-DNA bzw. dem gesamten Volumen eines Ligationsansatzes (5.2.6) versetzt. Die Zell-DNA-Suspension wurde 30 min auf Eis inkubiert und dabei gelegentlich durch leichtes Schütteln gemischt. Um die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zellen zu erreichen, wurden diese für 45 bis 90 s (je nach Stamm) einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und sofort danach auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 300 µl SOC-Medium (4.8.1) wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert, um die Expression des Gens für β -Lactamase und somit die Ausprägung der Ampicillinresistenz zu induzieren. Die Selektion positiver Transformanden erfolgte auf LB-Platten mit Ampicillin über Nacht bei 37°C.

5.1.3 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Mini und Midi Präparation)

Kleinere Mengen an Plasmid-DNA (bis zu 5 µg, Mini-Präparation) wurden folgendermaßen präpariert: Zunächst wurden 5 ml LB-Medium inklusive Ampicillin mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C hochgezogen. Anschließend wurde 1 ml der Bakterien-suspension für 5 min bei 1.200 g zentrifugiert und das so gewonnene Zellpellet in 100 µl Lösung I (4.8.3.1) resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Die alkalische Lyse der Zellen fand nach Zugabe von 200 µl Lösung II unter vorsichtigem Schwenken statt. Danach wurden 150 µl Lösung III zur Neutralisation zugegeben und der Ansatz erneut 5 min auf Eis inkubiert. Dabei entstand aus dem in Lösung III enthaltenen Kaliumacetat über eine chemische Reaktion Kaliumdodecylsulfat, welches mit den infolge der Lyse denaturierten Zellbestandteilen wie Proteinen, chromosomaler DNA und RNA unlösliche Komplexe bildet. Diese konnten über fünfminütige Zentrifugation bei 15.000 g abgetrennt werden. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die darin gelöste Plasmid-DNA nach Zugabe von 900 µl reinem Ethanol für 10 min auf Eis gefällt. Anschließend wurde das Präzipitat für 10 min bei 15.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um sämtlichen Ethanol zu entfernen, wurde das Plasmid-DNA Pellet für 10 min in einer Speedvac Zentrifuge getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 20 µl ddH₂O gelöst und bei -20°C gelagert. Die Mini-Präparation wurde vorwiegend zur Überprüfung von Klonierungen mittels Restriktionsverdau (5.2.5), nicht jedoch für weiterführende Methoden (z.B. Sequenzierung und Transfektion in Säugetierzellen), die einen höheren Reinheitsgrad des DNA-Produkts erfordern, verwendet. Aus diesem Grund kam für die Isolierung größerer Mengen an reiner Plasmid-DNA (Midi-Präparation) der HiSpeed™ Plasmid Midi Kit nach Angaben des beiliegenden Protokolls zum Einsatz. Dazu wurden 50 ml LB-Medium inkl. Ampicillin mit 100 µl Bakteriensuspension (aus einer Vorkultur) angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde mit 500 µl ddH₂O eluiert, auf ihre Konzentration und Reinheit vermessen (5.2.11) und bei -20°C gelagert.

5.2 Nukleinsäureanalytik

5.2.1 Isolation von genomischer DNA aus Zellen und murinem Gewebe

Die Isolation von genomischer DNA aus Säugetierzellen und murinem Gewebe wurde unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution der genomischen DNA erfolgte jeweils in 100 µl AE-Puffer.

5.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) dient der *in vitro* Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente in einem zellfreien System (Mullis *et al.*, 1986). Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 50 µl unter Verwendung des folgenden Reaktionsansatzes und Temperaturprofils:

Allgemeiner Reaktionsansatz:

10x <i>Taq</i> -Puffer	5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0,5 µl
Primer <i>forward</i> (20 mM)	1 µl
Primer <i>reverse</i> (20 mM)	1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
Template DNA	Plasmid-DNA 0,05 µg Genomische DNA 2 µg
ddH ₂ O	ad. 50 µl

Temperaturprofil:

Initiale Denaturierung	94°C	5 min
25 bis 45 Zyklen	Denaturierung	94°C 45 s
	Annealing	x°C 45 s
	Amplifikation	72°C 1 min/kb
Restamplifikation	72°C	5 min

Für die Amplifizierung von DNA-Regionen mit einem hohen Anteil an kurzen, repetitiven DNA-Elementen (Mikrosatelliten), die häufig in nicht-kodierenden Genombereichen (z.B. Promotoren) auftreten, wurden zusätzlich 10 µl an 5 M Betaine zum Reaktionsansatz gegeben. Die Annealing-Temperatur wurde an die jeweiligen Primer (4 bis 6°C unter deren Schmelztemperatur) und die Amplifikationszeit an die Länge des zu vervielfältigenden Fragments angepasst. Die Reaktion wurde in einem Peltier Thermal Cycler PTC-200 durchgeführt. Nach Ablauf der PCR wurde der Ansatz zur Überprüfung und Reinigung des Produkts auf ein analytisches Agarosegel (5.2.3) aufgetragen und anschließend wieder daraus isoliert (5.2.4).

5.2.3 Gelelektrophorese von DNA

DNA-Fragmente können in einem Agarosegel nach Anlegen eines elektrischen Feldes in Abhängigkeit von ihrer Länge aufgetrennt werden. Pro Gel wurden 1 bis 1,5 % (w/v) Agarose

in 1x TAE-Puffer (4.8.3.2) aufgekocht. Die DNA-Proben wurden mit 10x Auftragspuffer (4.8.3.2) versetzt, auf das Gel geladen und bei einer konstanten Spannung von 10 Volt pro Zentimeter Gel-Länge für 30-45 min in 1x TAE Puffer aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente durch zehnminütige Inkubation des Gels in einer Ethidiumbromidlösung (4.8.3.2) mittels UV-Licht als fluoreszierende Banden visualisiert. Mit einem DNA-Längenstandard (100 bp bzw. 1 kb), der standardmäßig in jeweils eine der Taschen aufgetragen wurde, konnte die Länge der DNA-Moleküle ermittelt werden.

5.2.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Für die Re-Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurden die gewünschten Banden mit einem frischen Einweg-Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die anschließende Extraktion der DNA aus der Gelmatrix erfolgte unter Verwendung des QIAquick® Gel Extraction Kits.

5.2.5 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifisch an (meist) palindromische Sequenzmotive einer DNA-Doppelhelix binden und die Spaltung von Phosphodiesterbindungen an ihrem Zucker-Phosphat-Rückgrat katalysieren. So entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge in Abhängigkeit von der Anzahl und Lage der Erkennungssequenzen innerhalb der Ziel-DNA. Die genaue Durchführung des Restriktionsverdaus entsprach den Angaben des Herstellers, wobei sich die Reaktionsbedingungen bezüglich Puffer, Temperatur und Zusatz von BSA (*bovine serum albumin*) je nach Enzym unterschieden.

Allgemeiner Reaktionsansatz:

10x Restriktionspuffer	2 µl
Restriktionsenzym(e)	je 5 bis 10 U
Plasmid-DNA	0,5 bis 1 µg
10x BSA (optional)	2 µl
ddH ₂ O	ad. 20 µl

5.2.6 Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmide (Ligation)

Zur Herstellung von Plasmiden mit einem DNA-Insert wurde ein entsprechendes DNA-Fragment über eine PCR (5.2.2) mit spezifischen Primern (inklusive Restriktionsschnittstellen) und genomischer DNA aus Blut amplifiziert. Sowohl der Ziel-Vektor als auch das Insert

wurden mit den gleichen Restriktionsendonukleasen verdaut und nach Aufreinigung über eine Gelelektrophorese (5.2.3) und anschließende Gelextraktion (5.2.4) in einer Ligationsreaktion miteinander verknüpft (ligiert). Dabei katalysiert das Enzym T4 DNA-Ligase die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den Enden beider DNA-Moleküle. Alle Ligationsreaktionen fanden nach dem folgenden Schema für 4 h bei Raumtemperatur statt. Im Anschluss wurde der gesamte Ligationsansatz in *E.coli* Zellen transformiert (5.1.2) und die über eine Midi-Präparation (5.1.3) gewonnene Plasmid-DNA sequenziert (5.2.12).

Allgemeiner Reaktionsansatz:

10x Ligasepuffer	2 µl
T4 DNA-Ligase	400 U
Plasmid-DNA	0,3 bis 0,5 µg
Insert-DNA	in 5-facher Kopiezahl des Vektors
ddH ₂ O	ad. 20 µl

5.2.7 Mutagenese-PCR (*site-directed* Mutagenese)

Um innerhalb der DNA-Sequenz eines Plasmids den dauerhaften Austausch von einem bis wenigen Nukleotid(en) zu erreichen, wurde die Methodik der *site-directed* Mutagenese angewendet. Hierfür wurde der QuickChange™ II Mutagenesis Kit nach Angaben des Herstellers benutzt. In dieser Arbeit wurde die Methode dazu verwendet, um das charakteristische 5'-GCC-GGC/G-3' Palindrom putativer AP-2 Bindestellen in Promotorregionen, welche im Vorfeld in Luziferase-Reportervektoren kloniert wurden, zu mutieren. Eine Besonderheit dieser Methode ist, dass anfangs eine PCR durchgeführt wird, bei der nicht wie bei konventionellen PCR-Reaktionen, ein lineares DNA-Fragment, sondern ein ganzes zirkuläres Plasmid amplifiziert wird. Dazu wurden komplementäre Primerpaare erstellt (4.6.1), welche nach dem Aufschmelzen des Plasmids in zwei einzelsträngige DNA-Ringe, an die gleichen Stellen beider Ringe binden. Während der mehrminütigen Amplifikationsphase werden die Primer dann durch eine spezielle *PfuUltra* DNA-Polymerase, mit einer etwa 18-fach geringeren Fehlerrate gegenüber der *Taq*-Polymerase, verlängert. Am Ende eines jeden Zyklus entstehen auf diese Weise aus jedem Ausgangs-Plasmid zwei neue Plasmide.

Um den Austausch der gewünschten Nukleotide in der Plasmid-DNA zu erreichen, wurden bei jedem der beiden Primer anstelle einiger zur Plasmid-DNA komplementären Nukleotide entsprechende alternative Nukleotide eingefügt. Um dennoch eine effektive Bindung der Primer an die DNA zu gewährleisten, liegen diese jeweils in der Mitte einer Sequenz aus 25 bis 45

Nukleotiden. Die Reaktion wurde in einem Peltier Thermal Cycler PTC-200 nach folgendem Schema durchgeführt:

Allgemeiner Reaktionsansatz:

Plasmid-DNA	25 ng
Reaction buffer (10x)	5 µl
Primer <i>forward</i>	125 ng
Primer <i>reverse</i>	125 ng
dNTP Mix	1 µl
<i>PfuUltra</i> DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	1 µl
ddH ₂ O	ad. 50 µl

Temperaturprofil:

Initiale Denaturierung	95°C	45 s
16 Zyklen	Denaturierung	1°C/s auf 95°C 45 s
	Annealing	1°C/s auf 55°C 1 min
	Amplifikation	1°C/s auf 68°C 1 min/kb

Nach der PCR wurden die Proben mit je 1 µl der Endonuklease DpnI (10 U/µl) behandelt, welche ausschließlich methylierte DNA spaltet, um die unmutierten Ausgangsplasmide, die für die Reaktion als *template* eingesetzt wurden, zu entfernen. Da bei der *in vitro* Amplifikation nur unmethylierte DNA synthetisiert wird, werden nur diejenigen Plasmide, welche aufgrund einer Vermehrung in *E.coli* Methylierungen tragen, durch das Enzym abgebaut. Am Ende blieben überwiegend mutierte Plasmide übrig. Diese wurden schließlich zur Vereinzelung bzw. Vermehrung in XL1-Blue *E.coli* Zellen transformiert. Nach Herstellung einer Midi-Präparation aus einer gewachsenen Einzelkolonie wurde die Mutagenese über eine Sequenzierung überprüft.

5.2.8 Isolation von RNA aus Säugetierzellen und murinen Geweben

Die Isolation von gesamtzellulärer RNA aus konfluent wachsenden Zellen erfolgte unter Verwendung des E.Z.N.A. Total RNA Kit I. Dazu wurden die Zellen mit PBS gespült, mit einem Zellschaber in 1 ml PBS von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst und anschließend über fünfminütige Zentrifugation bei 600 g pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen für 2 min in 350 µl TRK-Puffer, versetzt mit 2 % 2-Mercaptoethanol, lysiert. Die eigentliche RNA-Isolation erfolgte dann nach der dem Kit beiliegenden Anleitung. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass Plasmid-DNA, welche vorher in die Zellen transfiziert wurde, teilweise mit isoliert wird. Im Fall von Expressionsplasmiden, kann dies bei nachfolgenden qRT-PCR

Analysen (5.2.10) in Bezug auf das exprimierte Gen zu einem falsch-positiven Ergebnis führen, da die eingesetzten Primer die Plasmid-DNA ebenfalls als *template* erkennen. Aus diesem Grund muss zur Bestimmung des tatsächlichen Grades der Überexpression die Plasmid-DNA aus der isolierten RNA entfernt werden. Dazu wurde 1 µg RNA zusammen mit 2 µl DNase I, 2 µl DNase-Puffer und ddH₂O in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 2 h bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurden 2 µl EDTA zugegeben und der Ansatz für 2 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden davon 11 µl für die reverse Transkription in cDNA (5.2.9) eingesetzt.

Die Gewinnung von RNA aus murinem Knorpelgewebe erfolgte über mechanische Aufarbeitung nach Behandlung mit Flüssigstickstoff. Hierfür wurden die Gewebestücke in CryoTubesTM Schraubdeckelgefäßen in flüssigem Stickstoff auf etwa -196°C herunter gekühlt. Anschließend wurden die gefrorenen Proben mit einem Keramikstößel auf dem Deckel eines 50 ml FalconTM Reaktionsgefäßes pulverisiert. Vor ihrem Einsatz wurden beide Utensilien mit 70 %igem Ethanol und RNase AwayTM Lösung zur Entfernung von Verunreinigungen und RNasen gesäubert und ebenfalls in Flüssigstickstoff vorgekühlt. Das entstandene Pulver wurde mit einem sterilen Skalpell in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in dem die Lyse der Zellen mit 350 µl TRK-Puffer (Bestandteil des E.Z.N.A. Total RNA Kit I), versetzt mit 2 % 2-Mercaptoethanol, für 30 min auf Eis vollzogen wurde. Da Knorpelgewebeproben aufgrund des hohen Anteils an extrazellulärer Matrix nur eine vergleichsweise geringe absolute Zellzahl beinhalten, wurde für die RNA-Isolation der E.Z.N.A.® MicroElute® Total RNA Kit verwendet. Nach ihrer Elution in RNase-freiem ddH₂O wurde die RNA jeweils auf ihre Konzentration und Reinheit vermessen (5.2.11) und bei -20°C gelagert.

5.2.9 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription von mRNA in cDNA (engl. *complementary* DNA) wurden pro Reaktionsansatz 150 bis 500 ng an zuvor extrahierter gesamtzellulärer RNA (5.2.8) eingesetzt. Die Reaktion wurde in einem 19 µl Ansatz durchgeführt:

Allgemeiner Reaktionsansatz:

5x First Strand buffer	4 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
dNTPs (jeweils 10 mM)	1 µl
dN6 Primer (2 mg/ml)	1 µl
RNA + ddH ₂ O	11 µl

Um die Anlagerung der dN6 Primer (Hexanukleotide aller Sequenzkombinationen) an die RNA zu gewährleisten, wurde der Ansatz zunächst 5 min bei 70°C inkubiert, was zum Aufschmelzen von RNA-Sekundärstrukturen führt. Nach Abkühlen der Lösung auf RT wurde 1 µl (200 Units) Superscript II Reverse Transkriptase pro Reaktionsansatz zugegeben. Die reverse Transkription fand bei 37°C für 60 min statt, gefolgt von einer zehnminütigen Denaturierung des Enzyms bei 70°C. Noch vorhandene RNA wurde durch Zugabe von 1 µl RNase A Lösung (4.8.3.9) pro Ansatz und Inkubation für 25 min bei 37°C degradiert. Die so entstandene einzelsträngige cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

5.2.10 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Im Anschluss an die reverse Transkription (5.2.9) wurde zur Quantifizierung der relativen Expressionsrate ausgewählter Gene, die Methodik der quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR, engl. *quantitative real time-PCR*) unter Verwendung des LightCycler® 480 Systems durchgeführt. Über den, in doppelsträngige DNA interkalierenden, Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green kann die Menge eines cDNA-Fragments, welches während der Reaktion über eine PCR mit spezifischen Primern (4.6.2) amplifiziert wird, bestimmt werden. Dabei nimmt das gemessene Fluoreszenzsignal proportional mit der Menge an PCR-Produkten zu. Es steht somit in Korrelation zur Anfangskonzentration der zu amplifizierenden cDNA und kann zur Ermittlung der relativen Kopiezahl eines mRNA-Transkripts in einer Probe herangezogen werden.

Zur Normalisierung diente standardmäßig die Expressionsrate des Haushaltsgens β -Aktin (*ACTB*, *Actb*). In Ausnahmefällen wurde stattdessen *GAPDH* verwendet. Dies ist an entsprechender Stelle separat vermerkt. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen Software nach Angaben des Herstellers, wobei jeweils der Mittelwert von zwei einzelnen Ansätzen je Probe und Gen (Duplikate) für die Berechnung verwendet wurde.

Im Anschluss an die PCR wurde jeweils eine Schmelzpunktanalyse zur Kontrolle der spezifischen Amplifikation der cDNA-Sequenz durchgeführt. Jedes Produkt besitzt eine charakteristische Schmelztemperatur, die sowohl von seiner Produktlänge als auch von seinem GC-Gehalt abhängt. Die Messtemperatur (X) wurde dann bei allen weiteren Durchgängen an die Schmelztemperatur der Produkte angepasst. Zusätzlich wurde für jedes Primerpaar die Effizienz der Amplifikation pro Zyklus aus der Steigung einer Standardkurve bestimmt. Bei erstmaliger Verwendung eines neuen Primerpaars wurde nach der qRT-PCR eine Gelelektrophorese (5.2.3) durchgeführt und die Länge des entstandenen Produkts mit der zuvor berechneten, theoretischen Länge abgeglichen.

Allgemeiner Reaktionsansatz:

cDNA (7,5 bis 25 ng/μl)	1 μl
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	10 μl
Primer <i>forward</i> (20 mM)	0,5 μl
Primer <i>reverse</i> (20 mM)	0,5 μl
ddH ₂ O	8 μl

Temperaturprofil:

Initiale Denaturierung	4,4°C/s auf 95°C	10 min
45 Zyklen	Denaturierung	4,4°C/s auf 95°C 10 s
	Annealing	2,2°C/s auf 60°C 10 s
	Amplifikation	4,4°C/s auf 72°C 20 s
	Messung	4,4°C/s auf X°C 1 s
Schmelzpunktanalyse	4,4°C/s auf 95°C	5 s
	2,2°C/s auf 60°C	1 min
	0,11°C/s auf 97°C	
Ende	2,2°C/s auf 40°C	30 s

5.2.11 Konzentrationsbestimmung von DNA bzw. RNA

Plasmid-DNA aus Midi-Präparationen (5.1.3) sowie sämtliche isolierte RNA (5.2.8) wurden standardmäßig in einem Nanodrop® 2000 UV/Vis Spektralphotometer auf ihre Konzentration und Reinheit hin untersucht. Dazu wurden 1,3 μl der Probe auf die Kapillare des Geräts aufgetragen. Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde durch Messung der Extinktion E (optische Dichte; engl. *absorbance*) bei 260 nm ermittelt.

5.2.12 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Alle in dieser Arbeit erstellten Promotorkonstrukte (4.5.1.4) wurden von der Firma Entelechon (Bad Abbach) sequenziert. Dazu wurden jeweils 2 μg Plasmid-DNA aus Midi-Präparationen (5.1.3) abgegeben. Als Primer dienten die Oligonukleotide GLPrimer1 und GLPrimer2 für pGL2-Basic sowie GLPrimer2 und RVPrimer3 für pGL3-Basic Vektoren, welche von Entelechon bereitgestellt wurden. Die Auswertung erfolgte mittels der Software Chromas Lite.

5.2.13 *In situ* Hybridisierung

Für alle Arbeitsschritte wurden sterile, RNase-freie Chemikalien, Lösungen (4.8.3.8), Spitzen, Reaktionsgefäße und Glasküvetten verwendet. Potentielle RNase-Kontaminationen auf Oberflächen wurden mit RNase AWAY™ entfernt.

5.2.13.1 *In vitro* Transkription zur Erstellung von DIG-markierten RNA-Sonden

Nach Linearisierung der entsprechenden Plasmide (4.5.3) mit dem zur Herstellung von *antisense* Sonden nötigen Restriktionsenzym (4.5.3), wurden diese über Auftragung auf ein 1 %iges Agarosegel (5.2.3) und anschließende Gel-Extraktion (5.2.4) aufgereinigt. Anschließend wurde die *in vitro* Transkription nach folgendem Schema für 2 h bei 37°C durchgeführt:

Allgemeiner Reaktionsansatz:

Linearisierte Plasmid-DNA	1 µg
5x Transkriptionspuffer	4 µl
RNA-Polymerase	2 µl
RiboLock™ RNase Inhibitor	1 µl
DIG RNA Labeling Mix	2 µl
ddH ₂ O	ad. 20 µl

Im Anschluss wurden 1 µl tRNA (1 mg/ml), 7 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 75 µl reiner Ethanol zugegeben. Nach dreistündiger Fällung bei -80°C, erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 15.000 g und 4°C. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 15.000 g und 4°C zentrifugiert. Nach vollständiger Abnahme des Überstandes wurde das RNA-Pellet für 5 min bei 37°C getrocknet, anschließend in 100 µl RNase-freiem Wasser gelöst und bei -20°C gelagert. Vor erstmaliger Verwendung der Sonden wurde deren erfolgreiche Synthese bzw. Markierung mit Digoxigenin über einen Dot-Blot überprüft. Hierfür wurde auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid) Membran je 1 µl der gelösten Sonden aufgebracht und diese bei 70°C vollständig getrocknet. Nach zweimaligem Waschen für jeweils 5 min mit PBST (0,1 % Tween) wurde die Membran mit 3 % BSA in PBS für 30 min blockiert. Danach wurde die Membran erneut zweimal für je 5 min mit PBST gewaschen und anschließend für eine Stunde mit Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (1:5000 in PBST) (4.7) inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten erfolgte die Entwicklung im Dunkeln mit unverdünntem BM Purple AP Substrat.

5.2.13.2 Hybridisierung an Gewebeschnitten und Detektion

Vor der eigentlichen Hybridisierung mit den DIG-markierten Sonden (5.2.13.1) wurden die Gewebeschnitte (5.6.3) für 30 min bei 72°C inkubiert und dann folgendermaßen entparaffiniert:

Lösung	Inkubationszeit
Xylol	2x 10 min
100 % EtOH	2x 5 min
EtOH-Reihe (95, 90, 80, 70, 50, 30 %)	je 2 min
PBS	2x 5 min
4 % (w/v) PFA in PBS	30 min
10 µg/ml Proteinase K in Proteinase K-Puffer	10 min
PBS	5 min
2x SSC	2x 5 min
Tris/Glycin Puffer	15 min

Danach wurden die Schnitte für 3 h bei 55°C in BD Atlas™ Glass Hybridization Chambers in 1,8 ml Hybridisierungslösung (4.8.3.8) inkubiert. Anschließend wurden pro Schnitt jeweils 5 µl der DIG-markierten RNA-Sonden mit 150 µl Hybridisierungslösung vermischt und für 5 min bei 80°C denaturiert. Dieser Ansatz wurde jeweils zu den vorgelegten 1,8 ml Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung der Schnitte mit den Sonden erfolgte bei 55°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Schnitte aus den Kammern genommen und folgende Waschschrte durchgeführt:

Lösung	Inkubationszeit
2x SSC	2x 15 min
2x SSC	20 min, 50°C
1x SSC	20 min, 55°C
1x SSC	20 min, 60°C
1x SSC	10 min
NTE	15 min, 37°C
10 µg/ml RNase A in NTE	30 min, 37°C
NTE	15 min, 37°C
2x SSC	spülen
2x SSC	45 min, 50°C
1x SSC	spülen, 55°C
1x SSC	45 min, 55°C
1x SSC	45 min, 60°C
1x SSC	30 min

Im Anschluss wurden die Schnitte für 60 min mit 10 % (w/v) Blocking Reagent in MABT (4.8.3.8) überschichtet. Zum Nachweis der DIG-markierten Sonden wurden anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (4.7) 1:5000 in 1 % (w/v) Blocking Reagent in MABT verwendet. Dazu wurden die Schnitte jeweils mit einem Deckgläschen, welches zuvor an den Ecken mit Abstandshaltern aus Knetgummi versehen wurde, bedeckt und die Antikörperlösung in den so entstandenen Zwischenraum pipettiert. Die Antikörperreaktion fand über Nacht bei 4°C statt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 4x für je 10 min mit TBST und anschließend 3x für je 10 min mit NTM-Puffer gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte erneut mit einem Deckgläschen bedeckt (wie oben) und mit Färbelösung (4.8.3.8) für ein bis drei Tage in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Nach der Färbung wurden die Schnitte 3x für je 5 min mit PBS gewaschen und mit Kaisers Glycingelatine und einem Deckgläschen konserviert.

5.3 Proteinanalytik

5.3.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Zur Extraktion von Gesamtprotein wurden die konfluenten Zellen auf die gleiche Weise wie für die Isolation von RNA geerntet und pelletiert (5.2.8). Die Lyse der Zellen erfolgte nach Zugabe von je 200 µl RIPA Puffer (4.8.3.3) für 15 min bei 4°C in einem Schüttelinkubator. Über zehnminütige Zentrifugation bei 4°C und 15.000 g wurde die Zelldebris sedimentiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C eingefroren. Für die Isolation von Proteinextrakten zum Nachweis von HIF-1 α wurde ein abweichendes Protokoll verwendet. Nach der Ernte der Zellen wurden diese in 100 bis 200 µl HIF RIPA Puffer (4.8.3.3) resuspendiert und zum Scheren der DNA viermal für je 20 s in einem Ultraschallbad sonifiziert. Nach 15 min auf Eis wurde über zehnminütige Zentrifugation bei 4°C und 15.000 g die Zelldebris sedimentiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C eingefroren. Aufgrund der hohen Harnstoffkonzentration im HIF RIPA Puffer mussten die Proben zur Bestimmung der Proteinkonzentration (5.3.3) jeweils 1:3 mit Wasser verdünnt werden.

5.3.2 Herstellung von Kernproteinextrakten

Zur Isolation von Kernproteinextrakten wurde die Methode von Dignam und Kollegen angewendet (Dignam *et al.*, 1983). Dazu wurden Zellen in einer 75 cm² Kulturflasche bis zu einer Dichte von ungefähr 90 % herangezogen. Danach wurden die Zellen wie bereits

beschrieben geerntet (5.2.8). Zur Lyse der Zellmembran wurden 400 µl Puffer I (4.8.3.6) zugegeben und die Proben für 15 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden 25 µl des nichtionischen Tensids Nonidet® P-40 in zehnprozentiger Lösung hinzugefügt und der Ansatz durch leichtes Schütteln vermischt. Nach Zentrifugation bei 9.300 g und 4°C für 1 min setzten sich die Zellkerne als weißlicher Niederschlag ab und der Überstand mit den zytoplasmatischen Zellbestandteilen konnte dekantiert werden. Zur Freisetzung der Kernproteine wurden die Zellkerne mit 50 µl Puffer II für 15 min bei 4°C in einem Schüttelinkubator lysiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 15.000 g und 4°C befanden sich die Kernproteine im Überstand, während sich DNA- und Membranbestandteile am Boden absetzten. Die Kernproteinextrakte wurden sofort in 11 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Zur Bestimmung der Gesamt- und Kernproteinkonzentration in wässrigen Lösungen wurde der BCA-Protein-Assay Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Für jede Probe und jeden Standard wurde der Mittelwert aus zwei einzelnen Ansätzen herangezogen.

5.3.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dafür müssen sie in ihrer Primärstruktur, einer linearen Aminosäurekette, vorliegen. Dies wird durch Aufkochen der Proteinlösungen in modifiziertem Lämmli-Puffer erreicht, der die Detergenzien Natriumdodecylsulfat (SDS) und β -Mercaptoethanol enthält. Gleichzeitig sorgt SDS als anionisches Tensid für eine einheitlich negative Gesamtladung der Aminosäureketten, so dass diese bei Anlegen eines elektrischen Feldes alle in Richtung des positiven Pols wandern. Ein Gel auf Polyacrylamid(PAA)-Basis wirkt dabei als molekularer Filter. Nach der Elektrophorese liegen alle Proteine der Größe nach aufgetrennt vor und können durch weitere Verfahren wie einer Western Blot-Analyse (5.3.5) sichtbar gemacht werden. Für die SDS-PAGE wurden je 40 bis 70 µg an Gesamtproteinextrakt (5.3.1) in 1x Roti-Load Puffer für 10 min bei 70°C aufgekocht und anschließend bei 0,8 mA/cm² in einem PAA-Gel aufgetrennt. In dieser Arbeit wurden Trenngele mit 12,5 % (für AP-2 ϵ) und 8,75 % (für HIF-1 α) PAA verwendet (4.8.3.4). Die Proben wurden auf ein darübergeschichtetes Sammelgel mit einer PAA-Konzentration von 4 % geladen. Als Referenz wurde jeweils ein Proteinstandard mit aufgetragen.

5.3.5 Proteindetektion mittels Western Blot

Im Anschluss an eine SDS-PAGE (5.3.4) können ausgewählte Proteine mittels spezifischer Antikörper detektiert werden. Dazu müssen die im PAA-Gel befindlichen Proteine zunächst mittels Western Blot auf eine Membran übertragen werden. Hierfür wurde eine PVDF Membran für 10 min in Methanol und anschließend zusammen mit dem PAA-Gel und vier Whatman-Papieren für weitere 10 min in Transferpuffer (4.8.3.5) äquilibriert. Für den Aufbau des Western Blots wurden zuerst zwei Whatman-Papiere auf die positive Elektrode der Elektrophoretischen Zelle gelegt. Darauf wurden in folgender Reihenfolge die PVDF Membran, das Gel und zwei weitere Whatman-Papiere luftblasenfrei geschichtet. Der elektrophoretische Transfer erfolgte für 35 min bei einer konstanten Spannung von 15 Volt. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurde die Membran für eine Stunde in Blockierungslösung (4.8.3.5) auf einer Wippe und anschließend über Nacht bei 4°C mit einem Primär-Antikörper (4.7) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T (4.8.3.5) für je 5 min wurde die Membran mit einem AP-konjugierten, gegen den konstanten Teil des primären Antikörpers gerichteten, spezie-spezifischen Sekundär-Antikörper (4.7) in einer geeigneten Verdünnung in TBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T zur Entfernung freier Antikörper, wurde das Substrat für die Alkalische Phosphatase (BCIP/NBT Substrate Kit) zugegeben. Antikörper-gebundene Proteine werden als violette Banden sichtbar. Für densitometrische Vermessungen der Bandenintensität wurde die Software ImageJ verwendet.

5.3.6 *In vitro* Translation

Für die zellfreie Synthese von Proteinen (*in vitro* Translation) über eine gekoppelte Transkriptions-/Translationsreaktion wurde das TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System benutzt. Bei dieser Methode wird ein Lysat aus Kaninchen-Retikulozyten (Erythrozyten-Vorläuferzellen) verwendet, um die kodierende Region eines Expressionsplasmids in Protein zu übersetzen. Da dieser Zelltyp, genauso wie die später aus ihm hervorgehenden Erythrozyten, keinen Zellkern besitzt, ist zusätzlich eine (virale) RNA-Polymerase für die mRNA-Synthese von Nöten. Im Gegensatz zu Erythrozyten verfügen Retikulozyten jedoch über Ribosomen, was die Translation der entstandenen mRNA ermöglicht.

Das AP-2ε Expressionsplasmid, welches für die Herstellung der *in vitro* Translatate eingesetzt wurde (4.5.2), beinhaltet neben einem CMV-Promotor für die Expression in Säugetierzellen auch Promotorsequenzen des Bakteriophagen T7. Deshalb wurde hier eine T7-RNA-

Polymerase zur Transkription der kodierenden Region verwendet. Pro Plasmid wurde folgender Reaktionsansatz erstellt und für 90 min bei 30°C inkubiert. Zusätzlich wurde eine Kontrollreaktion mit dem Leervektor pCMX-PL1, bei der kein Protein entstand, durchgeführt. Im Anschluss wurden je 3,5 µl der Lysate für eine Western Blot-Analyse (5.3.5) zur Verifizierung der spezifischen Proteinsynthese eingesetzt.

Allgemeiner Reaktionsansatz:

TNT Mastermix (inkl. T7 RNA-Polymerase)	40 µl
Methionin	1 µl
Plasmid-DNA	1 µg
ddH ₂ O	ad. 50 µl

5.3.7 Immunhistologie

5.3.7.1 Hämatoxylin/Eosin(HE)-Färbung

Zur unspezifischen Anfärbung von Geweben wurden die Farbstoffe Hämatoxylin und Eosin verwendet. Hämatoxylin bzw. Hämalan führt zu einer violett-Färbung von Zellkernen und Kollagenfasern. Das zur Gegenfärbung verwendete Eosin lässt zytoplasmatische Bestandteile rosa bis orange erscheinen. Für die Färbung wurden Gewebeschnitte durch 30-minütige Inkubation bei 72°C und anschließende Behandlung mit Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert. Es folgten eine 5-minütige Färbung mit Hämatoxylin-Lösung und anschließend ein Waschschriff mit Leitungswasser. Nach der Färbung mit einer 1 %igen Eosin-Lösung für 45 s wurden die Schnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und unter Verwendung von Kaisers Glyceringelatine mit einem Deckgläschen versehen.

5.3.7.2 Immunhistochemischer Nachweis von *Cleaved Caspase 3*

Die immunhistochemischen Färbungen gegen *Cleaved Caspase 3* wurden von Herrn Rudolf Jung (Molekulare Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg) unter Verwendung des EnVision™+ HRP Rabbit (DAB+) Kits durchgeführt. Für die spezifische Färbung mit einem *Cleaved Caspase 3* Antikörper (4.7) wurden murine Gewebeschnitte nach 30-minütiger Inkubation bei 72°C und nachfolgender Behandlung mit Xylol entparaffiniert und in der absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte in Tris/EDTA Puffer in einem Schnellkochtopf bei 120°C für 5 min erhitzt. Nach dem Blockieren der endogenen Peroxidase mit H₂O₂ erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem primären Antikörper gegen

Cleaved Caspase 3 (1:50). Im Anschluss an einen Waschschrift erfolgte die Inkubation mit einem HRP-gekoppelten sekundären α -Kaninchen Antikörper (4.7) für 30 min, welcher nach einem weiteren Waschschrift durch Zugabe von DAB(+)-Lösung auf dem Gewebe visualisiert wurde. Abschließend wurden die Zellkerne mit Hämatoxylin gegengefärbt und die Objektträger mit einem Deckgläschen versehen.

5.4 Weitere molekularbiologische Methoden

5.4.1 Arbeiten mit Radioaktivität

5.4.1.1 Herstellung und Reinigung radioaktiv markierter DNA-Fragmente für EMSA

Zur Herstellung doppelsträngiger (ds) DNA-Fragmente für einen EMSA (5.4.1.2) wurden jeweils 10 μ l zweier komplementärer, einzelsträngiger Oligonukleotide (4.6.4) mit 80 μ l ddH₂O gemischt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Beim langsamen Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur kam es dann zur Zusammenlagerung der Oligonukleotide zu einem Doppelstrang (Annealing). Die radioaktive Markierung erfolgte im Anschluss mittels einer Polynukleotidkinase, wobei die γ -Phosphatgruppe am 5'-Ende der dsOligonukleotide gegen ein ³²P-Isotop ausgetauscht wurde. Dazu wurde der folgende Reaktionsansatz für 30 min bei 37°C inkubiert:

Allgemeiner Reaktionsansatz:

dsOligonukleotide	2 μ l
Polynukleotidkinase Puffer (10x)	2 μ l
Polynukleotidkinase	1 μ l
γ - ³² P-ATP	3 μ l
ddH ₂ O	ad. 20 μ l

Zur Abtrennung der radioaktiv markierten DNA-Fragmente von verbliebenen, nicht eingebauten γ -³²P-ATP Molekülen wurden Illustra Sephadex G-50 NICKTM Columns verwendet. Nach Ablassen der enthaltenen Pufferlösung wurde der ³²P-Markierungsansatz auf die Säule geladen und zweimal mit je 200 μ l TE- Puffer (pH 7,5) gespült, wobei es noch nicht zur Elution der Radioaktivität kam. Durch erneutes, zweimaliges Spülen der Säule mit jeweils 200 μ l TE-Puffer wurden zwei weitere Fraktionen gewonnen, welche den Großteil der benötigten ³²P-Oligonukleotide enthielten. Freies γ -³²P-ATP wurde in der Säule zurückgehalten. Für den EMSA wurde jeweils die Fraktion genutzt, welche die höhere Strahlungsintensität aufwies.

5.4.1.2 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Der *Electrophoretic Mobility Shift Assay* oder auch Gelshift Assay dient dem *in vitro* Nachweis von DNA-Protein-Wechselwirkungen. Diese Methode beruht auf einem veränderten Laufverhalten von DNA-Fragmenten mit gebundenen Proteinen im Gegensatz zu freier DNA in nativen Polyacrylamidgelen. In dieser Arbeit wurde die Technik dazu verwendet, um eine Interaktion des Transkriptionsfaktors AP-2 ϵ mit putativen AP-2 Bindestellen in den Promotorsequenzen möglicher Zielgene nachzuweisen.

Dazu wurden doppelsträngige Oligonukleotide mit den entsprechenden Sequenzmotiven radioaktiv markiert (5.4.1.1) und mit Kernproteinextrakten (5.3.2) in dem nachfolgenden Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Unterdrückung unspezifischer DNA-Protein-Wechselwirkungen wurde das synthetische Polymer Poly(dI-dC)•Poly(dI-dC) zugegeben. Zum Nachweis für die Spezifität der Bindung zwischen Proteinen und DNA wurden in Kontrollansätzen unmarkierte Oligonukleotide mit der gleichen Sequenz in 400-fachem Überschuss als Kompetitor hinzugefügt. Außerdem wurden in einem weiteren Ansatz 5 μ l eines spezifischen AP-2 ϵ Antiserums (4.7) zugegeben. War AP-2 ϵ Bestandteil der Protein-DNA-Komplexe wurden diese durch den Antikörper zu einem Super-Shift retardiert. Für spezielle Fragestellungen wurden, alternativ zu Kernproteinextrakt, 5 μ l an *in vitro* translatiertem Protein (5.3.6) eingesetzt.

Allgemeiner Reaktionsansatz:

³² P-Oligonukleotide (ca. 20.000 cpm/ μ l)	2 bis 3 μ l
5x EMSA-Bindepuffer	4 μ l
Poly(dI-dC) (1 mg/ml)	1 μ l
Kernextrakt	5 bis 10 μ g
ddH ₂ O	ad. 20 μ l

Vor dem Auftragen auf ein natives, 4,8 %iges Polyacrylamidgel (4.8.3.7) wurden die Ansätze mit je 4 μ l EMSA-Ladepuffer (4.8.3.7) versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 10 V/cm für 2,5 h in 0,25x TBE-Puffer (4.8.3.7). Nach dem Lauf wurde das Gel auf Whatman-Filterpapier übertragen und in einem Vakuumgeltrockner für 1 h und 45 min bei 75°C getrocknet. Zur autoradiographischen Analyse wurde für 24 bis 72 Stunden (je nach Qualität und Quantität der radioaktiven Strahlung) ein Röntgenfilm aufgelegt und dieser anschließend in einem X-Omat 2000 Processor entwickelt.

5.4.2 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Diese Technik wird verwendet, um die direkte Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit bestimmten, genomischen DNA-Regionen *in vivo* nachzuweisen. Die eigentliche Chromatin-Immunopräzipitation wurde bereits im Vorfeld von Dr. A.K. Wenke in der Abteilung für Molekulare Pathologie am Universitätsklinikum Regensburg mit Chromatin aus frisch isolierten Chondrozyten von Osteoarthritis-Patienten durchgeführt. Dafür wurde der CHIP-ITTM Express Kit Enzymatic nach dem beiliegenden Protokoll benutzt. Für den Versuch wurde das isolierte Chromatin durch enzymatischen Verdau fragmentiert und anschließend diejenigen DNA-Fragmente, an die AP-2 ϵ gebunden hatte, mit einem spezifischen α -AP-2 ϵ Antiserum (4.7) präzipitiert. Für entsprechende Kontroll-Präzipitationen mit einem unspezifischen IgG Antikörper bzw. einem α -RNA-Polymerase II Antikörper diente der CHIP-ITTM Control Kit - Human. Nach Verdau aller Proteinbestandteile wurden die, je nach verwendetem Antikörper, angereicherten DNA-Sequenzen in einer PCR mit dem LightCycler® II System analysiert. Hierfür wurden Primerpaare verwendet, welche putative, genomische Bindestellen von AP-2 ϵ umspannen (4.6.3). Als Positivkontrolle dienten Primer, die eine bestimmte Region im *GAPDH* Promotor amplifizieren, von der bekannt ist, dass dort RNA-Polymerase II bindet. Als Negativkontrolle wurden Primer verwendet, die eine intergenische DNA-Region amplifizieren, an die keine Transkriptionsfaktoren binden. Beide sind Bestandteil des CHIP-ITTM Control Kits - Human. Die Reaktionen wurden nach folgendem Schema durchgeführt und das Ergebnis anschließend auf einem 1,5 %igen Agarosegel (5.2.3) visualisiert. Für die Auswertung war insbesondere der Unterschied in der Amplifikationsrate zwischen Chromatin, welches mit dem α -AP-2 ϵ bzw. dem unspezifischen IgG Antikörper präzipitiert wurde, ausschlaggebend.

Allgemeiner Reaktionsansatz:

DNA aus ChIP-Ansätzen	1 μ l
SYBR® Premix Ex Taq TM	10 μ l
Primer <i>forward</i> (20 mM)	0,5 μ l
Primer <i>reverse</i> (20 mM)	0,5 μ l
ddH ₂ O	8 μ l

Temperaturprofil:

Initiale Denaturierung	20°C/s auf 95°C	30 s
30 bis 40 Zyklen	Denaturierung	20°C/s auf 95°C 3 s
	Annealing	20°C/s auf 60°C 6 s
	Amplifikation	20°C/s auf 72°C 16 s
Ende	20°C/s auf 72°C	30 s

5.4.3 Detektion von Glykosaminoglykanen (GAG) in Lösungen

Glykosaminoglykane (GAG) sind lineare anionische Polysaccharide. Sie liegen in der Knorpelmatrix nicht einzeln als freie Moleküle, sondern gebunden an sogenannte Kernproteine (z.B. Aggrecan) in Form von Proteoglykanen vor (vgl. 1.1). Bei der enzymatischen Spaltung des Kernproteins werden die Glykosaminoglykane aus der Knorpelmatrix freigesetzt und können über den kationischen Farbstoff Alcian Blau nachgewiesen werden (Bjornsson, 1993). In dieser Arbeit wurde dafür der Wieslab® sGAG quantitative kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Am Ende des Versuchs wurden die Proben in einem ELISA-Reader bei 650 nm vermessen, wobei die Intensität der Farbreaktion die Menge an freigesetzten GAG widerspiegelt.

5.4.4 MMP13 Aktivitäts-Assay

Zur Messung der Aktivität des Enzyms Matrix-Metalloproteinase 13 (Mmp13) in Überständen von *in vitro* kultivierten, murinen Knorpelimplantaten (5.6.7) wurde der SensoLyte® 520 MMP - 13 Assay Kit *Fluorimetric* nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Mmp13 Substrat kommt dabei ein Peptid mit einer gekoppelten Fluoreszenzgruppe zum Einsatz. Diese wird durch einen ebenfalls an das Peptid gekoppelten Quencher unterdrückt. Nach Mmp13-vermittelter Spaltung des Peptids an einer internen Spaltungsstelle, werden die Fluoreszenzgruppe und der Quencher räumlich getrennt, so dass ein Fluoreszenzsignal emittiert wird. Dieses wurde in einem FLUOstar Omega Fluoreszenz-Reader bei einer Anregung von 485 nm und einer Emission von 520 nm vermessen. Dabei steht die Intensität des Fluoreszenzsignals in direkter Korrelation mit der Menge an gespaltenen Peptiden und somit auch der Mmp13 Aktivität in den Überständen.

5.5 Zellkulturmethoden

5.5.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese bei einer Konfluenz von etwa 90 % mittels Trypsin/EDTA Lösung (0,05 bzw. 0,02 % (w/v)) vom Boden einer 75 cm² Kulturflasche gelöst, pelletiert und in 5 ml des entsprechenden Kulturmediums (4.8.1) aufgenommen. Jeweils 900 µl dieser Zellsuspension wurden zusammen mit 900 µl kaltem Einfriermedium in Kryoröhrchen pipettiert. Diese wurden umgehend in einen Nalgene "Mr. Frosty" Freezing Container überführt und für mindestens 24 h bei -80°C zwischengelagert. Die langfristige Aufbewahrung der Zellen

fand bei -196°C in flüssigem Stickstoff statt. Um Zellen wieder aus dem Flüssigstickstoff aufzutauen, wurden die Zellen zügig bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut und in 8 ml Kulturmedium überführt. Nach Zentrifugation für 4 min bei 280 g wurden die Zellen in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine 25 cm^2 Zellkulturflasche ausgesät.

5.5.2 Kultivierung von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien und primären Zellen, mit Ausnahme von mMSC, wurden in DMEM high glucose (4,5 g/l), versetzt mit 10 % FKS (v/v) und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (v/v) (4.8.2), bei 37°C und 8 % CO_2 kultiviert. Murine mesenchymale Stammzellen wurden in mMSC-Kultivierungsmedium (4.8.1) bei 37°C und 5 % CO_2 vermehrt. Zum Passagieren der adhären Zellen bei 90 bis 95 %iger Konfluenz wurden diese, nach einmaligem Waschen mit PBS, mit 1 ml Trypsin/EDTA Lösung (0,05 bzw. 0,02 % (w/v)) bei 37°C inkubiert, bis sie sich vom Boden der Zellkulturflasche gelöst hatten. Anschließend wurden die flottierenden Zellen in 9 ml Kultivierungsmedium aufgenommen und für 4 min bei 280 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellett resuspendiert und 1:5 bis 1:20 in neue Zellkulturflaschen mit vorgelegtem Kultivierungsmedium verteilt. Das Medium wurde jeweils zweimal pro Woche erneuert. Für einzelne Experimente wurde anstelle von Kultivierungsmedium ein gesondertes Medium eingesetzt. Dies ist an entsprechender Stelle vermerkt.

5.5.3 Transiente Transfektion von Zellen mit Nukleinsäuren

Zur transienten Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA und siRNA wurde die Lipofektamin Methode herangezogen. Lipofektamin besteht aus kationischen Lipiden, welche in wässriger Lösung Liposomen ausbilden und Nukleinsäuren umschließen. Nach Zugabe zu adhären Zellen fusionieren diese Komplexe mit den Zellmembranen, wodurch die enthaltenen Nukleinsäuren ins Zytoplasma eingeschleust werden. Für die Lipofektion von Plasmid-DNA wurde Lipofectamine® LTX Reagent zusammen mit Lipofectamine® PLUS™ Reagent nach Angaben des Herstellers verwendet, wobei je nach Versuch 5 bis 500 ng an DNA pro Ansatz eingesetzt und die Zellen im Anschluss für 24 bis 48 h bis zum Versuchsende inkubiert wurden. Für die Lipofektion von siRNA wurde je nach siRNA-Spezies entweder Lipofectamine® 2000 oder Lipofectamine® RNAiMAX verwendet. Dabei wurden 100 bzw. 60 pmol siRNA pro Ansatz eingesetzt und die Zellen im Anschluss für 48 bis 72 h inkubiert. Die optimalen Bedingungen wurden für jede siRNA und Zelltyp in Vorversuchen ermittelt.

5.5.4 Luziferase Reportergen Assay

Zur Durchführung von Luziferase Assays wurde das Dual-Luciferase® Reporter Assay System verwendet. Um die Aktivität eines Promotors oder eines Enhancer- bzw. Repressorelements zu analysieren, wurde ein entsprechendes DNA-Fragment zunächst vor das Reporter-gen (*Luziferase*) eines pGL Vektors (4.5.1.1) kloniert. Die Expression des *Luziferase*-Gens steht somit in direktem Verhältnis zum Aktivierungspotenzial des klonierten DNA-Fragments. Durch Zugabe eines Substrats (Luziferin) für das, durch das Reporter-gen kodierte, Enzym kommt es zu einer Lichtreaktion (Chemilumineszenz). Diese kann in einem Luminometer quantitativ vermessen werden und spiegelt somit die Aktivität der klonierten DNA-Sequenz wider. Um Unterschiede in der Transfektionseffizienz der einzelnen Ansätze eines Experiments auszugleichen, wurden die Zellen zusätzlich mit dem Kontrollvektor pRL-TK (4.5.1.2) transfiziert, welcher ein modifiziertes *Luziferase*-Gen aus der Oktokoralle *Renilla reniformis* enthält. Die durch die Renilla-Luziferase hervorgerufene Chemilumineszenz wurde parallel erfasst und zum Abgleich der zuvor gemessenen Werte eingesetzt. Es wurden je nach Zelltyp 150 bis 250 tausend Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät und mittels Lipofektion (5.5.3) transfiziert, wobei jeweils Doppelansätze mit identischen Behandlungen erstellt wurden. In dieser Arbeit wurden von den zu testenden Reporter-genplasmiden standardmäßig je 500 ng und von pRL-TK 100 ng pro Ansatz eingesetzt. Die Menge zusätzlicher Expressionsplasmide wurde je nach Versuchsaufbau variiert. 24 h später wurde das Kulturmedium von den transfizierten Zellen dekantiert und die Wells zweimal mit Leitungswasser gespült. Anschließend wurden pro Well 300 µl Lysispuffer (1x) zugegeben und die Zellen 20 min unter leichtem Schütteln lysiert. Nach der Lyse wurden je 50 µl eines Versuchsansatzes im Luminometer vermessen. Für die Auswertung wurde jeweils der Mittelwert aus zwei Duplikaten herangezogen. Die erhaltenen Werte für die Luziferaseaktivität von allen verwendeten Promotorkonstrukten wurden jeweils mit denen des entsprechenden Leervektors, unter identischer Behandlung, in Relation gesetzt.

5.5.5 Herstellung und Differenzierung von Zellaggregaten aus hMSC

Für die Herstellung von Zellaggregaten (Sphäroiden) aus hMSC wurden diese nach ihrer Ernte in hMSC-Differenzierungsmedium (4.8.1) aufgenommen und auf eine Konzentration von 200.000 Zellen pro 300 µl Medium eingestellt. Für jedes Aggregat wurden je 300 µl dieser Zellsuspension in ein Well einer Nunc® MicroWell™ 96-well V-bottom Platte gegeben. Im Anschluss wurde die Platte bei 500 g für 5 min zentrifugiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die am nächsten Tag entstandenen Aggregate wurden entweder für

Versuche unter hydrostatischer Belastung eingesetzt (5.5.6) oder für weitere 3 Wochen in hMSC-Differenzierungsmedium inkubiert, um die Stammzellen chondrogen zu differenzieren. In letzterem Fall wurde das Medium dreimal pro Woche gewechselt. Für die Experimente wurden Zellen bei einer Passage von 2 bis 4 verwendet.

5.5.6 Hydrostatische, *in vitro* Belastung von Zellaggregaten

Die hydrostatische Belastung von Zellaggregaten aus hMSC (5.5.5) wurde an der Abteilung für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. P. Angele und Herrn Dr. Richard Kujat zusammen mit Frau Daniela Drenkard nach dem von Angele *et al.*, 2003 und Angele *et al.*, 2004 beschriebenen Ablauf in einer eigens dafür entwickelten Apparatur durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 8 Sphäroide in sterile 2,3 ml Glasgefäße transferiert, diese vollständig mit hMSC-Differenzierungsmedium (4.8.1) aufgefüllt und luftblasenfrei verschlossen. Anschließend wurden die Glaszylinder zusammen mit PBS in einen sterilen Dialysebeutel überführt und dieser ebenfalls luftblasenfrei mit einem Folien-schweißgerät versiegelt. Danach wurde das Paket in die Druckkammer der Belastungsapparatur gegeben und für 4 h mit einer Frequenz von 1 Hz bei 37°C sinusoidal belastet. Der minimale Druck betrug bei diesem Programm 0,55 MPa und der Maximaldruck 5,03 MPa. Nach jeder Belastungsphase wurde das Medium gewechselt und die Zellaggregate im Brutschrank weiter kultiviert. Entsprechende Kontrollen wurden identisch behandelt, aber nicht belastet. Zu gegebenen Zeitpunkten wurden die Aggregate für die Isolation von RNA geerntet und je nach Versuch über eine unterschiedlich lange Gesamtperiode belastet bzw. danach weiter inkubiert.

5.5.7 Induktion hypoxischer Bedingungen mittels DP/DFX oder 1 % O₂

Für die Behandlung von mMSC (5.6.6) mit den Hypoxie-simulierenden Eisenchelatoren 2,2'-Dipyridyl (DP; gelöst in EtOH) und Desferrioxamin (DFX; gelöst in Wasser) wurden die Zellen in 6-Well Platten für 24 h bis zu einer Dichte von etwa 60 % kultiviert. Anschließend fand ein Mediumswechsel statt und DP bzw. DFX wurde in einer Konzentration von 100 und 250 µM zugegeben. Respektive Kontrollansätze wurde nur mit dem entsprechenden Lösungsmittel versehen. Nach 24 h wurde RNA aus den Zellen isoliert (5.2.8). Für die Kultivierung von mMSC unter Sauerstoffmangel (Hypoxie) wurden die Zellen wie oben ausgesät und in einen New Brunswick Galaxy 48 R CO₂ Inkubator mit einer Sauerstoffkonzentration von 1 % O₂ transferiert. Entsprechende Kontrollen wurden unter Normoxie (21 % O₂) inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und für die Isolation von RNA (5.2.8) weiter prozessiert.

5.6 Arbeiten mit Mäusen

5.6.1 Zucht- und Haltungsbedingungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden in konventioneller Haltung nach den Richtlinien der Zentralen Tierlaboratorien der Universität Regensburg gezüchtet und versorgt. Der Hell-Dunkel-Wechsel erfolgte im Zwölf-Stunden Rhythmus bei konstant 22°C. Die Gabe von Wasser und Standard-Pelletfutter erfolgte *ad libidum*. Die Zucht erfolgte nach den Empfehlungen des tierärztlichen Dienstes der Universität Regensburg. Das Mindestalter bei Zuchtbeginn betrug 7,5 Wochen.

5.6.2 Genotypisierung von *Tfap2e* *-/-* und WT Mäusen bzw. Embryonen

Aus einer ca. 2 mm großen Schwanzspitzen-Biopsie wurde die genomische DNA isoliert (5.2.1) und in 100 µl AE-Puffer eluiert. Anschließend wurde eine PCR unter gleichzeitiger Verwendung von drei spezifischen Primern (4.6.5) für den *Tfap2e* Genlocus bzw. die *Neomycin*-Kassette durchgeführt. Zusätzlich wurde jeweils eine Negativkontrolle ohne DNA sowie eine Positivkontrolle mit DNA aus einer heterozygoten Maus mitamplifiziert.

Allgemeiner Reaktionsansatz:

genomische DNA	2 µl
FailSafe PCR 2x PreMix D	25 µl
Primer mAP-2ε gen anti2 (20 mM)	0,5 µl
Primer mAP-2ε gen sense2 (20 mM)	0,5 µl
Primer pGK polyA down (20 mM)	0,5 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
ddH ₂ O	21 µl

Temperaturprofil:

Initiale Denaturierung		95°C	5 min
10 Zyklen; Verringerung der Annealing Temperatur von initial 63°C um 1°C pro Zyklus	Denaturierung	95°C	30 s
	Annealing	X°C	30 s
	Amplifikation	72°C	30 s
30 Zyklen	Denaturierung	95°C	30 s
	Annealing	53°C	30 s
	Amplifikation	72°C	30 s
Ende		72°C	5 min

Über eine anschließende Agarosegelelektrophorese (5.2.3) wurden die spezifischen Bandenmuster zur Bestimmung des Genotyps analysiert. Bei WT Mäusen wurde ein ca. 100 bp und bei *Tfap2e* ^{-/-} Mäusen ein ca. 300 bp großes DNA-Fragment amplifiziert. Bei heterozygoten Mäusen entstanden beide Produkte. Ein Beispiel ist in Abbildung 5.1 gezeigt.

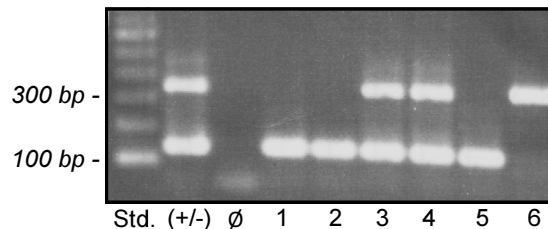


Abb. 5.1: Beispiel für die Auswertung einer Genotypisierung auf AP-2 ϵ Defizienz

Nach Durchführung der entsprechenden PCR-Reaktion mit genomischer DNA aus Mausschwanzspitzen wurden die Proben auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Nach Inkubation in einer Ethidiumbromidlösung wurde das Bandenmuster mit einem mitgeführten DNA-Standard (Std.) abgeglichen. In diesem Beispiel waren in der Positivkontrolle (+/-) mit DNA aus einem heterozygoten Tier beide Banden sichtbar, während bei der Negativkontrolle (Ø) kein DNA Fragment amplifiziert wurde. Bei den Proben 1, 2 und 5 handelte es sich um homozygote Wildtyp Tiere (Bande bei ca. 100 bp), bei Probe 6 um eine *Tfap2e* ^{-/-} Maus (Bande bei ca. 300 bp) und bei den Proben 3 und 4 um heterozygote *Tfap2e* +/- Mäuse (beide Banden).

5.6.3 Herstellung von Paraffinmaterial

Für *in situ* Hybridisierungen (5.2.13) sowie immunhistologische und H/E-Färbungen (5.3.7) an Mausgewebe und Embryonen wurden Paraffinpräparate hergestellt. Dafür wurde das Gewebe bzw. die Embryonen in Einbettkassetten für 24 bis 72 h bei RT in einer 5 %igen Formaldehyd/PBS-Lösung fixiert. Knochenhaltige Gewebepreparate wurden zur Entkalkifizierung zusätzlich für sieben Tage in einer EDTA-Lösung (0,8 M, pH 7,4) inkubiert. Nach der Dehydrierung wurde das Gewebematerial in Paraffin eingebettet und bei RT gelagert. Für alle Untersuchungen wurden 3 µm Dünnschnitte angefertigt und auf Glasobjektträger übertragen.

5.6.4 Isolation von murinen Embryonen spezifischen Alters

Für die *in vivo* Analyse von Knorpelstrukturen während der Embryonalentwicklung von WT und *Tfap2e* ^{-/-} Mäusen wurden Embryonen beider Genotypen über *in situ* Hybridisierungen (5.2.13) miteinander verglichen. Dafür wurden heterozygote Elterntiere verpaart, die hieraus entstandenen Embryonen isoliert und in einer 5 %igen Formaldehyd/PBS-Lösung fixiert. Zuvor wurde bei allen Embryonen eine Schwanzspitzenbiopsie durchgeführt und die hieraus ge-

wonnene DNA für eine Genotypisierung (5.6.2) eingesetzt. Anschließend wurden homozygote WT bzw. *Tfap2e* ^{-/-} Föten für die Herstellung von Dünnschnitten weiterprozessiert (5.6.3). Um ein spezifisches Alter der Embryonen bei ihrer Entnahme zu gewährleisten, wurden zwei Elterntiere für 12 h miteinander verpaart und das Gewicht des Weibchens bei der Trennung protokolliert. Dieser Zeitpunkt wurde als Tag E0,5 definiert. Elf Tage später wurden die Weibchen erneut gewogen (Tag E11,5) und eine potentielle Schwangerschaft über eine Gewichtszunahme von mindestens 3 Gramm diagnostiziert. Nicht schwangere Mäuse wurden wieder für die Verpaarung eingesetzt. Daneben wurden Embryonen im Alter von E11,5 Tagen für die Erstellung von *Micromass*-Kulturen aus mesenchymalen Zellen der Extremitätenknospen benötigt. Dafür wurden die Embryonen wie unter 5.6.5 beschrieben weiter prozessiert.

5.6.5 *Micromass*-Kultivierung embryonaler, mesenchymaler Zellen

Die *in vitro* Differenzierung von isolierten mesenchymalen Zellen aus den Extremitätenknospen von Mausembryonen wurde über sogenannte *Micromass*- bzw. Hochdichtekulturen durchgeführt. Dabei werden die Zellen in sehr hoher Dichte kultiviert, was zu einem mehrschichtigen und damit dreidimensionalen System führt. Infolgedessen werden chondrogene Differenzierungsprozesse induziert, welche in Form von lokal begrenzten Knötchen (*nodules*) sichtbar werden. Über deren Anzahl und Größe sowie zusätzliche Genexpressionsanalysen kann das Differenzierungsverhalten von Zellen unterschiedlicher Herkunft bzw. Behandlung verglichen werden (Ahrens *et al.*, 1977; DeLise *et al.*, 2000b; Handschel *et al.*, 2007).

Pro Experiment wurden hierfür jeweils 3 bis 6 Embryonen (12 bis 24 Extremitätenknospen) eines Wurfes verwendet. Da für die *Micromass*-Kultivierung pro Durchgang mindestens drei Embryonen eines Genotyps benötigt wurden und darüber hinaus eine zwischengeschaltete Genotypisierung aufgrund der zeitlichen Abfolge nicht möglich war, wurden hier homozygote Elterntiere für die Generierung der Embryonen eingesetzt.

Für die Versuche wurden die Extremitätenknospen von WT und *Tfap2e* ^{-/-} Embryonen (E11,5) isoliert (5.6.4) und durch Inkubation mit Dispase (1 U/ml) gelöst in DMEM/Ham's F12 (1:1), versetzt mit 10 % FKS und Penicillin/Streptomycin (1x), für eine Stunde bei 37°C dissoziiert. Über vorsichtiges Auf- und Abpipettieren und Passage durch einen 40 µm Zellfilter wurde eine Suspension aus Einzelzellen erstellt. Anschließend wurden die Zellen über vierminütige Zentrifugation bei 280 g pelletiert und in einer Konzentration von 20.000 Zellen pro µl in DMEM/Ham's F12 (1:1), versetzt mit 10 % FKS und Penicillin/Streptomycin (1x), aufgenommen. Hiervon wurden jeweils 10 µl mittig in die Wells einer 24-Well Platte gegeben und

diese bis zur Anheftung der Zellen für 3 h bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Danach wurde jedes Well mit 800 µl *Micromass*-Medium (4.8.1) geflutet und die Platte für insgesamt vier Tage bei 37°C kultiviert, wobei das Medium jeden Tag gewechselt wurde. Beginnend mit Tag 0 (kurz nach dem Fluten der Wells) wurden je zwei Kulturen für die Isolation von RNA (5.2.8) geerntet. Außerdem fand an den Tagen 1 bis 4 nach Aussaat eine Behandlung von je einer *Micromass*-Kultur mit Alcian Blau Lösung zur Anfärbung von sauren Glykosaminoglykanen und somit zur Visualisierung der Knötchen statt. Dazu wurden, nach zweimaligem Waschen mit PBS, 500 µl Kahle's Fixans (4.8.3.9) zugegeben und die Zellen für 15 min fixiert. Anschließend wurde die Kultur je einmal mit 0,1 M HCl und PBS gespült und mit 500 µl 1 % Alcian Blau in 0,1 M HCl für 2 h bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde ungebundene Färbelösung über mehrere Waschschrte mit 70 %igem EtOH und PBS entfernt.

5.6.6 Isolation mesenchymaler Stammzellen aus murinem Knochenmark

mMSC wurden aus dem Knochenmark von *Femur* und *Tibia* von Mäusen im Alter von 6 bis 8 Wochen isoliert. Pro Isolation wurden die Hinterläufe von 6 Tieren vom Rumpf abgetrennt, die Pfoten entfernt und die Röhrenknochen vom umliegenden Gewebe befreit. Zur Gewinnung des Knochenmarks, wurden diese mittig durchtrennt und mit der Schnittfläche nach unten in 1,5 ml Reaktionsgefäßen für 2 min bei 600 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in mMSC-Kultivierungsmedium (4.8.1) resuspendiert, vereint und für 5 min bei 280 g pelletiert. Abschließend wurden die Zellen in 20 ml mMSC-Kultivierungsmedium resuspendiert, auf zwei 75 cm² Zellkulturflaschen verteilt und bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Abtrennung von nicht adhärenen Zellen (z.B. Erythrozyten und Leukozyten) erfolgte nach 24 h ein Mediumwechsel. Die zurückbleibenden konfluenten Stammzellen wurden als Passage Null angesehen und wie unter 5.5.2 beschrieben weiter kultiviert. Für einzelne Versuche wurden jeweils Zellen aus zwei unabhängigen Isolationen in Passage 3 bis 6 verwendet.

5.6.7 In vitro Kultivierung von Hüftknorpelimplantaten

Um physiologische Prozesse im Knorpel von WT und *Tfap2e* ^{-/-} Mäusen besser vergleichen zu können, wurden Knorpelimplantate *in vitro* kultiviert. Da sich der artikuläre Knorpelüberzug des Hüftkopfes im Vergleich zum Kniegelenk leichter und ohne starke mechanische Beeinträchtigung vom *Femur*-Knochen, abtrennen lässt, wurde dieser für die Experimente verwendet. Nach der Isolation (zwei Stück pro Maus) wurde das Gewicht der pfannenförmigen Knorpelimplantate bestimmt und je ein Explantat pro Well einer 24-Well-Platte mit 500 µl

DMEM high glucose, versetzt mit 10 % FKS, Penicillin/Streptomycin (1x) und Amphotericin B (0,5 µg/ml), gegeben. Nach Inkubation der Platte für 2 Tage bei 37°C im Brutschrank, wurde das Medium abgenommen und jedes Well zweimal mit Serum-freiem Medium, versetzt mit Penicillin/Streptomycin (1x) und Amphotericin B (0,5 µg/ml), gespült und anschließend mit 400 µl desselben Mediums geflutet. In jedes zweite Well wurde zusätzlich ein spezifischer MMP13 Inhibitor (Pyrimidine-4,6-dicarboxylic acid, bis-(4-fluoro-3-methyl-benzylamide)) in einer Konzentration von 100 nM zugegeben (pro Maus also je ein Explantat mit bzw. ohne Inhibitor). Nach weiterer Inkubation für 4 Tage bei 37°C, wurde das Medium abgenommen, bei -20°C eingefroren und später für die Bestimmung der Mmp13 Aktivität (5.4.4) bzw. der freigesetzten GAG-Menge (5.4.3) eingesetzt. Abschließend wurde die genomische DNA aus den Explantaten als indirektes Maß für die enthaltene Zahl an Chondrozyten isoliert und deren Konzentration vermessen (5.2.11). Sowohl das Gewicht als auch der DNA-Gehalt wurden zur Normalisierung der gemessenen Mmp13 Aktivität und GAG-Konzentration herangezogen.

5.6.8 Induktion einer Osteoarthritis in murinen Kniegelenken

Alle Eingriffe an Mäusen zur Induktion einer Osteoarthritis wurden unter Anleitung von Herrn Dr. T. Schubert (Institut für angewandte Pathologie, Speyer), der bereits eine vergleichbare Studie mit der MIA/CD-RAP defizienten Maus durchgeführt hatte (Schmid *et al.*, 2011), ausgeführt.

Dazu wurden 6 bis 8 Wochen alte WT und *Tfp2e* ^{-/-} Mäuse mit 0,75 % Ketamin und 0,16 % Xylazin in 0,9 %iger Natriumchloridlösung anästhesiert. Davon wurden pro Gramm Körpergewicht 10 µl intraperitoneal injiziert. Unter Narkose wurde die Kniekapsel des rechten Hinterlaufes medial eröffnet, ohne die Patellarsehne zu durchtrennen. Anschließend wurde der mediale Meniskus unter Verwendung einer feinen Kanüle vorsichtig vom *Tibia*-Plateau abgehoben, so dass er in der Kniekapsel frei beweglich war. Zum Verschluss der Wunde diente eine Metallklammer. Am linken Hinterlauf wurde eine entsprechende Kontroll-Operation (Sham) durchgeführt, jedoch ohne den Meniskus abzulösen. Pro Durchgang wurden sowohl WT als auch eine vergleichbare Anzahl *Tfp2e* ^{-/-} Mäuse parallel behandelt.

10 bzw. 17 Tage später wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet, jeweils beide Kniegelenke freipräpariert und für die Einbettung in Paraffin (5.6.3) bzw. die Isolation von RNA aus dem Gelenkknorpel (5.2.8) vorbereitet. Aufgrund dieser Prozedur kam es in den behandelten Kniegelenken zu einer Überbelastung der hyalinen Knorpeloberflächen, einhergehend mit Knorpelschäden vergleichbar zu einer OA. Diese wurden mit dem

Bewertungssystem nach Pritzker und Kollegen von Herrn Dr. Schubert qualitativ und quantitativ analysiert (Pritzker *et al.*, 2006). In einem Vorversuch ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Geschlechtern, weshalb für die Studie sowohl weibliche als auch männliche Tiere in etwa gleichem Verhältnis verwendet wurden.

5.7 Licht- und Transmissions-Elektronenmikroskopie

Für die Analyse und Dokumentation von *in situ* Hybridisierungen (5.2.13), immunhistologischen und H/E-Färbungen (5.3.7) sowie *Micromass*-Kulturen (5.6.5) wurden das Lichtmikroskop Axiovert 200 mit der Kamera AxioCam MRc und die Software AxioVs40 eingesetzt.

Die Durchführung der Transmissions-Elektronenmikroskopie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. J. Schroeder und Herrn H. Siegmund (Institut für Pathologie, Uniklinikum Regensburg). Hierfür wurden die Ober- und Unterschenkelknochen von WT und *Tfap2e*^{-/-} Mäusen im Alter von 6 bis 7 Wochen präpariert, mit 1 ml Karnovsky's-Reagenz (2,5 % Glutaraldehyd/ 1 % Paraformaldehyd) über Nacht fixiert und der artikuläre Knorpel wie beschrieben für die weitere Durchführung prozessiert (Moser *et al.*, 2002; Tatzel *et al.*, 2005). Die Bilder wurden anschließend von Herrn Prof. Dr. E. Hunziker (Orthopädische Chirurgie, Uniklinikum Bern, Schweiz) begutachtet.

5.8 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe der GraphPad Prism 5.00 Software durchgeführt. Alle Experimente wurden, mit Ausnahme von ChIP, EMSA und den Belastungsexperimenten, in mindestens drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert bzw. relativer Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Die Berechnung auf signifikante Veränderungen der Ergebnisse zwischen den Versuchsgruppen wurde mittels des Student's t-Tests durchgeführt. Ein *P*-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet. Hierbei galt: *: *P*<0,05; **: *P*<0,01; ***: *P*<0,001; ns: nicht signifikant.

6 Literaturverzeichnis

- Adams, C.S. and I.M. Shapiro (2002). The fate of the terminally differentiated chondrocyte: evidence for microenvironmental regulation of chondrocyte apoptosis. *Crit Rev Oral Biol Med* 13 (6): 465-73.
- Ahrens, P.B., M. Solursh and R.S. Reiter (1977). Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. *Dev Biol* 60 (1): 69-82.
- Aigner, T., H.A. Kim and H.I. Roach (2004). Apoptosis in osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 30 (3): 639-53.
- Aigner, T., H. Stoss, G. Weseloh, G. Zeiler and K. von der Mark (1992). Activation of collagen type II expression in osteoarthritic and rheumatoid cartilage. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 62 (6): 337-45.
- Aigner, T., A. Zien, A. Gehrsitz, P.M. Gebhard and L. McKenna (2001). Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology. *Arthritis Rheum* 44 (12): 2777-89.
- Akhtar, N., Z. Rasheed, S. Ramamurthy, A.N. Anbazhagan, F.R. Voss and T.M. Haqqi (2010). MicroRNA-27b regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritis chondrocytes. *Arthritis Rheum* 62 (5): 1361-71.
- Akiyama, H., M.C. Chaboissier, J.F. Martin, A. Schedl and B. de Crombrughe (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 16 (21): 2813-28.
- Akiyama, H., J.P. Lyons, Y. Mori-Akiyama, X. Yang, R. Zhang, Z. Zhang, J.M. Deng, *et al.* (2004). Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev* 18 (9): 1072-87.
- Alcaraz, M.J., J. Megias, I. Garcia-Arnandis, V. Clerigues and M.I. Guillen (2010). New molecular targets for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol* 80 (1): 13-21.
- Amano, M., K. Chihara, K. Kimura, Y. Fukata, N. Nakamura, Y. Matsuura and K. Kaibuchi (1997). Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science* 275 (5304): 1308-11.
- Amarilio, R., S.V. Viukov, A. Sharir, I. Eshkar-Oren, R.S. Johnson and E. Zelzer (2007). HIF1alpha regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis. *Development* 134 (21): 3917-28.
- Ameye, L., D. Aria, K. Jepsen, A. Oldberg, T. Xu and M.F. Young (2002). Abnormal collagen fibrils in tendons of biglycan/fibromodulin-deficient mice lead to gait impairment, ectopic ossification, and osteoarthritis. *FASEB J* 16 (7): 673-80.
- Ameye, L. and M.F. Young (2002). Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology* 12 (9): 107-16.
- Amling, M., L. Neff, S. Tanaka, D. Inoue, K. Kuida, E. Weir, W.M. Philbrick, *et al.* (1997). Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone-related peptide in a signaling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development. *J Cell Biol* 136 (1): 205-13.
- Angele, P., D. Schumann, M. Angele, B. Kinner, C. Englert, R. Hente, B. Fuchtmeyer, *et al.* (2004). Cyclic, mechanical compression enhances chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds. *Biorheology* 41 (3-4): 335-46.
- Angele, P., J.U. Yoo, C. Smith, J. Mansour, K.J. Jepsen, M. Nerlich and B. Johnstone (2003). Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. *J Orthop Res* 21 (3): 451-7.
- Appleton, C.T., V. Pitelka, J. Henry and F. Beier (2007). Global analyses of gene expression in early experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 56 (6): 1854-68.

- Balcerzak, M., E. Hamade, L. Zhang, S. Pikula, G. Azzar, J. Radisson, J. Bandorowicz-Pikula, *et al.* (2003). The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochim Pol* 50 (4): 1019-38.
- Ballock, R.T., A. Heydemann, L.M. Wakefield, K.C. Flanders, A.B. Roberts and M.B. Sporn (1993). TGF-beta 1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases. *Dev Biol* 158 (2): 414-29.
- Bamforth, S.D., J. Braganca, J.J. Eloranta, J.N. Murdoch, F.I. Marques, K.R. Kranc, H. Farza, *et al.* (2001). Cardiac malformations, adrenal agenesis, neural crest defects and exencephaly in mice lacking Cited2, a new Tfp2 co-activator. *Nat Genet* 29 (4): 469-74.
- Barry, F., R.E. Boynton, B. Liu and J.M. Murphy (2001). Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res* 268 (2): 189-200.
- Barter, M.J., C. Bui and D.A. Young (2012). Epigenetic mechanisms in cartilage and osteoarthritis: DNA methylation, histone modifications and microRNAs. *Osteoarthritis Cartilage* 20 (5): 339-49.
- Bhosale, A.M. and J.B. Richardson (2008). Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull* 87: 77-95.
- Bi, W., J.M. Deng, Z. Zhang, R.R. Behringer and B. de Crombrughe (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22 (1): 85-9.
- Bi, W., W. Huang, D.J. Whitworth, J.M. Deng, Z. Zhang, R.R. Behringer and B. de Crombrughe (2001). Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (12): 6698-703.
- Bijlsma, J.W., F. Berenbaum and F.P. Lافeber (2011). Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet* 377 (9783): 2115-26.
- Billinghurst, R.C., L. Dahlberg, M. Ionescu, A. Reiner, R. Bourne, C. Rorabeck, P. Mitchell, *et al.* (1997). Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* 99 (7): 1534-45.
- Bjornsson, S. (1993). Simultaneous preparation and quantitation of proteoglycans by precipitation with alcian blue. *Anal Biochem* 210 (2): 282-91.
- Blackburn, T.A. and E. Craig (1980). Knee anatomy: a brief review. *Phys Ther* 60 (12): 1556-60.
- Bode, W., C. Fernandez-Catalan, F. Grams, F.X. Gomis-Ruth, H. Nagase, H. Tschesche and K. Maskos (1999). Insights into MMP-TIMP interactions. *Ann N Y Acad Sci* 878: 73-91.
- Boos, N., A.G. Nerlich, I. Wiest, K. von der Mark, R. Ganz and M. Aebi (1999). Immunohistochemical analysis of type-X-collagen expression in osteoarthritis of the hip joint. *J Orthop Res* 17 (4): 495-502.
- Borzi, R.M., I. Mazzetti, S. Macor, T. Silvestri, A. Bassi, L. Cattini and A. Facchini (1999). Flow cytometric analysis of intracellular chemokines in chondrocytes in vivo: constitutive expression and enhancement in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *FEBS Lett* 455 (3): 238-42.
- Borzi, R.M., I. Mazzetti, G. Magagnoli, S. Paoletti, M. Uguccioni, R. Gatti, G. Orlandini, *et al.* (2002). Growth-related oncogene alpha induction of apoptosis in osteoarthritis chondrocytes. *Arthritis Rheum* 46 (12): 3201-11.
- Braganca, J., J.J. Eloranta, S.D. Bamforth, J.C. Ibbitt, H.C. Hurst and S. Bhattacharya (2003). Physical and functional interactions among AP-2 transcription factors, p300/CREB-binding protein, and CITED2. *J Biol Chem* 278 (18): 16021-9.
- Buckwalter, J.A., D. Mower, R. Ungar, J. Schaeffer and B. Ginsberg (1986). Morphometric analysis of chondrocyte hypertrophy. *J Bone Joint Surg Am* 68 (2): 243-55.
- Bush, P.G., C.A. Parisinos and A.C. Hall (2008). The osmotic sensitivity of rat growth plate chondrocytes in situ; clarifying the mechanisms of hypertrophy. *J Cell Physiol* 214 (3): 621-9.

- Capasso, O., N. Quarto, F. Descalzi-Cancedda and R. Cancedda (1984). The low molecular weight collagen synthesized by chick tibial chondrocytes is deposited in the extracellular matrix both in culture and in vivo. *EMBO J* 3 (4): 823-7.
- Carrington, J.L. (2005). Aging bone and cartilage: cross-cutting issues. *Biochem Biophys Res Commun* 328 (3): 700-8.
- Castagnola, P., G. Moro, F. Descalzi-Cancedda and R. Cancedda (1986). Type X collagen synthesis during in vitro development of chick embryo tibial chondrocytes. *J Cell Biol* 102 (6): 2310-7.
- Cawston, T.E. (1996). Metalloproteinase inhibitors and the prevention of connective tissue breakdown. *Pharmacol Ther* 70 (3): 163-82.
- Cawston, T.E. and A.J. Wilson (2006). Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20 (5): 983-1002.
- Chadjichristos, C., C. Ghayor, M. Kypriotou, G. Martin, E. Renard, L. Ala-Kokko, G. Suske, *et al.* (2003). Sp1 and Sp3 transcription factors mediate interleukin-1 beta down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes. *J Biol Chem* 278 (41): 39762-72.
- Chazaud, C., M. Oulad-Abdelghani, P. Bouillet, D. Decimo, P. Chambon and P. Dolle (1996). AP-2.2, a novel gene related to AP-2, is expressed in the forebrain, limbs and face during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 54 (1): 83-94.
- Chen, C., D.T. Tambe, L. Deng and L. Yang (2013). Biomechanical properties and mechanobiology of the articular chondrocyte. *Am J Physiol Cell Physiol* 305 (12): 1202-8.
- Chen, F.H., K.T. Rousche and R.S. Tuan (2006). Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2 (7): 373-82.
- Chen, M., M. Zhu, H. Awad, T.F. Li, T.J. Sheu, B.F. Boyce, D. Chen, *et al.* (2008). Inhibition of beta-catenin signaling causes defects in postnatal cartilage development. *J Cell Sci* 121 (Pt 9): 1455-65.
- Chivers, M.D. and S.D. Howitt (2009). Anatomy and physical examination of the knee menisci: a narrative review of the orthopedic literature. *J Can Chiropr Assoc* 53 (4): 319-33.
- Chuong, C.M., R.B. Widelitz, T.X. Jiang, U.K. Abbott, Y.S. Lee and H.M. Chen (1993). Roles of adhesion molecules NCAM and tenascin in limb skeletogenesis: analysis with antibody perturbation, exogenous gene expression, talpid mutants and activin stimulation. *Prog Clin Biol Res* 383B: 465-74.
- Cole, B.J., T.R. Carter and S.A. Rodeo (2003). Allograft meniscal transplantation: background, techniques, and results. *Instr Course Lect* 52: 383-96.
- Colvin, J.S., B.A. Bohné, G.W. Harding, D.G. McEwen and D.M. Ornitz (1996). Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 12 (4): 390-7.
- Cooper, K.L., S. Oh, Y. Sung, R.R. Dasari, M.W. Kirschner and C.J. Tabin (2013). Multiple phases of chondrocyte enlargement underlie differences in skeletal proportions. *Nature* 495 (7441): 375-8.
- D'Angelo, M., Z. Yan, M. Nooreyazdan, M. Pacifici, D.S. Sarmant, P.C. Billings and P.S. Leboy (2000). MMP-13 is induced during chondrocyte hypertrophy. *J Cell Biochem* 77 (4): 678-93.
- Davies, S.R., S. Sakano, Y. Zhu and L.J. Sandell (2002). Distribution of the transcription factors Sox9, AP-2, and [delta]EF1 in adult murine articular and meniscal cartilage and growth plate. *J Histochem Cytochem* 50 (8): 1059-65.
- Day, T.F., X. Guo, L. Garrett-Beal and Y. Yang (2005). Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 8 (5): 739-50.
- Day, T.F. and Y. Yang (2008). Wnt and hedgehog signaling pathways in bone development. *J Bone Joint Surg Am* 90 Suppl 1: 19-24.
- DeLise, A.M., L. Fischer and R.S. Tuan (2000a). Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage* 8 (5): 309-34.

- DeLise, A.M., E. Stringa, W.A. Woodward, M.A. Mello and R.S. Tuan **(2000b)**. Embryonic limb mesenchyme micromass culture as an in vitro model for chondrogenesis and cartilage maturation. *Methods Mol Biol* 137: 359-75.
- Denker, A.E., S.B. Nicoll and R.S. Tuan **(1995)**. Formation of cartilage-like spheroids by micromass cultures of murine C3H10T1/2 cells upon treatment with transforming growth factor-beta 1. *Differentiation* 59 (1): 25-34.
- Descalzi Cancedda, F., A. Melchiori, R. Benelli, C. Gentili, L. Masiello, G. Campanile, R. Cancedda, *et al.* **(1995)**. Production of angiogenesis inhibitors and stimulators is modulated by cultured growth plate chondrocytes during in vitro differentiation: dependence on extracellular matrix assembly. *Eur J Cell Biol* 66 (1): 60-8.
- Dietz, U.H. and L.J. Sandell **(1996)**. Cloning of a retinoic acid-sensitive mRNA expressed in cartilage and during chondrogenesis. *J Biol Chem* 271 (6): 3311-6.
- Dignam, J.D., P.L. Martin, B.S. Shastry and R.G. Roeder **(1983)**. Eukaryotic gene transcription with purified components. *Methods Enzymol* 101: 582-98.
- Dong, Y.F., Y. Soung do, E.M. Schwarz, R.J. O'Keefe and H. Drissi **(2006)**. Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor. *J Cell Physiol* 208 (1): 77-86.
- Dreier, R. **(2010)**. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Res Ther* 12 (5): 216.
- Ducy, P., R. Zhang, V. Geoffroy, A.L. Ridall and G. Karsenty **(1997)**. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89 (5): 747-54.
- Duval, E., S. Leclercq, J.M. Elissalde, M. Demoor, P. Galera and K. Boumediene **(2009)**. Hypoxia-inducible factor 1alpha inhibits the fibroblast-like markers type I and type III collagen during hypoxia-induced chondrocyte redifferentiation: hypoxia not only induces type II collagen and aggrecan, but it also inhibits type I and type III collagen in the hypoxia-inducible factor 1alpha-dependent redifferentiation of chondrocytes. *Arthritis Rheum* 60 (10): 3038-48.
- Eames, B.F., P.T. Sharpe and J.A. Helms **(2004)**. Hierarchy revealed in the specification of three skeletal fates by Sox9 and Runx2. *Dev Biol* 274 (1): 188-200.
- Echtermeyer, F., J. Bertrand, R. Dreier, I. Meinecke, K. Neugebauer, M. Fuerst, Y.J. Lee, *et al.* **(2009)**. Syndecan-4 regulates ADAMTS-5 activation and cartilage breakdown in osteoarthritis. *Nat Med* 15 (9): 1072-6.
- Eckert, D., S. Buhl, S. Weber, R. Jager and H. Schorle **(2005)**. The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol* 6 (13): 246.
- Ehlen, H.W., L.A. Buelens and A. Vortkamp **(2006)**. Hedgehog signaling in skeletal development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 78 (3): 267-79.
- Enomoto, H., M. Enomoto-Iwamoto, M. Iwamoto, S. Nomura, M. Himeno, Y. Kitamura, T. Kishimoto, *et al.* **(2000)**. Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J Biol Chem* 275 (12): 8695-702.
- Enomoto, M., P.S. Leboy, A.S. Menko and D. Boettiger **(1993)**. Beta 1 integrins mediate chondrocyte interaction with type I collagen, type II collagen, and fibronectin. *Exp Cell Res* 205 (2): 276-85.
- Erlebacher, A., E.H. Filvaroff, S.E. Gitelman and R. Derynck **(1995)**. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* 80 (3): 371-8.
- Felson, D.T. **(2006)**. Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med* 354 (8): 841-8.
- Feng, W., F. Simoes-de-Souza, T.E. Finger, D. Restrepo and T. Williams **(2009)**. Disorganized olfactory bulb lamination in mice deficient for transcription factor AP-2epsilon. *Mol Cell Neurosci* 42 (3): 161-71.
- Feng, W. and T. Williams **(2003)**. Cloning and characterization of the mouse AP-2 epsilon gene: a novel family member expressed in the developing olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci* 24 (2): 460-75.
- Fernandes-Alnemri, T., G. Litwack and E.S. Alnemri **(1994)**. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem* 269 (49): 30761-4.

- Finger, A.R., C.Y. Sargent, K.O. Dulaney, S.H. Bernacki and E.G. Loba (2007). Differential effects on messenger ribonucleic acid expression by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells seeded in agarose constructs due to ramped and steady applications of cyclic hydrostatic pressure. *Tissue Eng* 13 (6): 1151-8.
- Forsyth, C.B., A. Cole, G. Murphy, J.L. Bienias, H.J. Im and R.F. Loeser, Jr. (2005). Increased matrix metalloproteinase-13 production with aging by human articular chondrocytes in response to catabolic stimuli. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 60 (9): 1118-24.
- Fosang, A.J., K. Last, V. Knauper, G. Murphy and P.J. Neame (1996). Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13). *FEBS Lett* 380 (1-2): 17-20.
- Foster, J.W. (1996). Mutations in SOX9 cause both autosomal sex reversal and campomelic dysplasia. *Acta Paediatr Jpn* 38 (4): 405-11.
- Furumatsu, T. and T. Ozaki (2010). Epigenetic regulation in chondrogenesis. *Acta Med Okayama* 64 (3): 155-61.
- Gannon, J.M., G. Walker, M. Fischer, R. Carpenter, R.C. Thompson, Jr. and T.R. Oegema, Jr. (1991). Localization of type X collagen in canine growth plate and adult canine articular cartilage. *J Orthop Res* 9 (4): 485-94.
- Gardner, H., J. Kreidberg, V. Koteliensky and R. Jaenisch (1996). Deletion of integrin alpha 1 by homologous recombination permits normal murine development but gives rise to a specific deficit in cell adhesion. *Dev Biol* 175 (2): 301-13.
- Gaubatz, S., A. Imhof, R. Dosch, O. Werner, P. Mitchell, R. Buettner and M. Eilers (1995). Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2. *EMBO J* 14 (7): 1508-19.
- Gerber, H.P., T.H. Vu, A.M. Ryan, J. Kowalski, Z. Werb and N. Ferrara (1999). VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5 (6): 623-8.
- Gerster, T., C.G. Balmaceda and R.G. Roeder (1990). The cell type-specific octamer transcription factor OTF-2 has two domains required for the activation of transcription. *EMBO J* 9 (5): 1635-43.
- Ghayor, C., J.F. Herrouin, C. Chadjichristos, L. Ala-Kokko, M. Takigawa, J.P. Pujol and P. Galera (2000). Regulation of human COL2A1 gene expression in chondrocytes. Identification of C-Krox-responsive elements and modulation by phenotype alteration. *J Biol Chem* 275 (35): 27421-38.
- Giancotti, F.G. and E. Ruoslahti (1999). Integrin signaling. *Science* 285 (5430): 1028-32.
- Gibson, G. (1998). Active role of chondrocyte apoptosis in endochondral ossification. *Microsc Res Tech* 43 (2): 191-204.
- Glasson, S.S. (2007). In vivo osteoarthritis target validation utilizing genetically-modified mice. *Curr Drug Targets* 8 (2): 367-76.
- Goggs, R., S.D. Carter, G. Schulze-Tanzil, M. Shakibaei and A. Mobasheri (2003). Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis. *Vet J* 166 (2): 140-58.
- Goldring, M.B. (2012). Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 4 (4): 269-85.
- Goldring, M.B. and S.R. Goldring (2007). Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 213 (3): 626-34.
- Goldring, M.B., K. Tsuchimochi and K. Ijiri (2006). The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97 (1): 33-44.
- Guilak, F. (2011). Biomechanical factors in osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 25 (6): 815-23.
- Guo, J., U.I. Chung, D. Yang, G. Karsenty, F.R. Bringhurst and H.M. Kronenberg (2006). PTH/PTHrP receptor delays chondrocyte hypertrophy via both Runx2-dependent and -independent pathways. *Dev Biol* 292 (1): 116-28.

- Guo, X., K.K. Mak, M.M. Taketo and Y. Yang (2009). The Wnt/beta-catenin pathway interacts differentially with PTHrP signaling to control chondrocyte hypertrophy and final maturation. *PLoS One* 4 (6): e6067.
- Hall, B.K. (1988). The Embryonic-Development of Bone. *American Scientist* 76 (2): 174-81.
- Hall, B.K. and T. Miyake (1992). The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis. *Anat Embryol (Berl)* 186 (2): 107-24.
- Hamalainen, L., J. Oikarinen and K.I. Kivirikko (1985). Synthesis and degradation of type I procollagen mRNAs in cultured human skin fibroblasts and the effect of cortisol. *J Biol Chem* 260 (2): 720-5.
- Handschel, J.G., R.A. Depprich, N.R. Kubler, H.P. Wiesmann, M. Ommerborn and U. Meyer (2007). Prospects of micromass culture technology in tissue engineering. *Head Face Med* 3: 4.
- Hartmann, C. (2009). Transcriptional networks controlling skeletal development. *Curr Opin Genet Dev* 19 (5): 437-43.
- Hascall, V.C., T.R. Oegema and M. Brown (1976). Isolation and characterization of proteoglycans from chick limb bud chondrocytes grown in vitro. *J Biol Chem* 251 (11): 3511-9.
- Hashimoto, K., M. Otero, K. Imagawa, M.C. de Andres, J.M. Coico, H.I. Roach, R.O. Oreffo, *et al.* (2013). Regulated transcription of human matrix metalloproteinase 13 (MMP13) and interleukin-1beta (IL1B) genes in chondrocytes depends on methylation of specific proximal promoter CpG sites. *J Biol Chem* 288 (14): 10061-72.
- Hermansson, M., Y. Sawaji, M. Bolton, S. Alexander, A. Wallace, S. Begum, R. Wait, *et al.* (2004). Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin betaA (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. *J Biol Chem* 279 (42): 43514-21.
- Hess, J., D. Porte, C. Munz and P. Angel (2001). AP-1 and Cbfa/runt physically interact and regulate parathyroid hormone-dependent MMP13 expression in osteoblasts through a new osteoblast-specific element 2/AP-1 composite element. *J Biol Chem* 276 (23): 20029-38.
- Hesse, K., K. Vaupel, S. Kurt, R. Buettner, J. Kirfel and M. Moser (2011). AP-2delta is a crucial transcriptional regulator of the posterior midbrain. *PLoS One* 6 (8): e23483.
- Hilger-Eversheim, K., M. Moser, H. Schorle and R. Buettner (2000). Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene* 260 (1-2): 1-12.
- Hill, C.L., D.J. Hunter, J. Niu, M. Clancy, A. Guermazi, H. Genant, D. Gale, *et al.* (2007). Synovitis detected on magnetic resonance imaging and its relation to pain and cartilage loss in knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 66 (12): 1599-603.
- Hinchcliffe, J.R. and D.R. Johnson (1980). The Development of the Vertebrate Limb. Oxford, UK, Oxford University Press.
- Hirsch, M.S., L.E. Lunsford, V. Trinkaus-Randall and K.K. Svoboda (1997). Chondrocyte survival and differentiation in situ are integrin mediated. *Dev Dyn* 210 (3): 249-63.
- Hojo, H., S. Ohba, F. Yano and U.I. Chung (2010). Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development. *J Bone Miner Metab* 28 (5): 489-502.
- Horton, W.A. (1990). The biology of bone growth. *Growth Genet Horm* 6: 1-3.
- Horton, W.A. (1993). Cartilage morphology. In: *Extracellular Matrix and Heritable Disorder of Connective Tissue*. P.M. Royce and B. Steinman. New York, Alan R. Liss: 73-84.
- Horton, W.A. and C.R. Degnin (2009). FGFs in endochondral skeletal development. *Trends Endocrinol Metab* 20 (7): 341-8.
- Hovmoller, M.L., A. Osuna, O. Eklof, K. Fredga, A. Hjerpe, J. Linsten, M. Ritzen, *et al.* (1977). Camptomelic dwarfism. A genetically determined mesenchymal disorder combined with sex reversal. *Hereditas* 86 (1): 51-62.

- Huang, W., U.I. Chung, H.M. Kronenberg and B. de Crombrughe (2001). The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (1): 160-5.
- Huang, Z., H. Xu and L. Sandell (2004). Negative regulation of chondrocyte differentiation by transcription factor AP-2alpha. *J Bone Miner Res* 19 (2): 245-55.
- Humphries, M.J. (2000). Integrin structure. *Biochem Soc Trans* 28 (4): 311-39.
- Hunziker, E.B., R.K. Schenk and L.M. Cruz-Orive (1987). Quantitation of chondrocyte performance in growth-plate cartilage during longitudinal bone growth. *J Bone Joint Surg Am* 69 (2): 162-73.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110 (6): 673-87.
- Ikeda, T., S. Kamekura, A. Mabuchi, I. Kou, S. Seki, T. Takato, K. Nakamura, *et al.* (2004). The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum* 50 (11): 3561-73.
- Imagawa, M., R. Chiu and M. Karin (1987). Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP. *Cell* 51 (2): 251-60.
- Inada, M., Y. Wang, M.H. Byrne, M.U. Rahman, C. Miyaura, C. Lopez-Otin and S.M. Krane (2004). Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (49): 17192-7.
- James, C.B. and T.L. Uhl (2001). A review of articular cartilage pathology and the use of glucosamine sulfate. *J Athl Train* 36 (4): 413-9.
- Jang, K.W., J.A. Buckwalter and J.A. Martin (2013). Inhibition of cell-matrix adhesions prevents cartilage chondrocyte death following impact injury. *J Orthop Res*.
- Jimenez, M.J., M. Balbin, J.M. Lopez, J. Alvarez, T. Komori and C. Lopez-Otin (1999). Collagenase 3 is a target of Cbfa1, a transcription factor of the runt gene family involved in bone formation. *Mol Cell Biol* 19 (6): 4431-42.
- Johnson, C., D. Primorac, M. McKinstry, J. McNeil, D. Rowe and J.B. Lawrence (2000). Tracking COL1A1 RNA in osteogenesis imperfecta. splice-defective transcripts initiate transport from the gene but are retained within the SC35 domain. *J Cell Biol* 150 (3): 417-32.
- Johnson, K.A., D.M. Rose and R.A. Terkeltaub (2008). Factor XIIIa mobilizes transglutaminase 2 to induce chondrocyte hypertrophic differentiation. *J Cell Sci* 121 (Pt 13): 2256-64.
- Jones, A.R., J.P. Gledhill, C.E. Hughes, L.J. Fitz, R. Zollner, S.D. Wainwright, B. Caterson, *et al.* (2007). Binding and localization of recombinant lubricin to articular cartilage surfaces. *J Orthop Res* 25 (3): 283-92.
- Kallio, P.J., I. Pongratz, K. Gradin, J. McGuire and L. Poellinger (1997). Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (11): 5667-72.
- Kallio, P.J., W.J. Wilson, S. O'Brien, Y. Makino and L. Poellinger (1999). Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 274 (10): 6519-25.
- Kamekura, S., K. Hoshi, T. Shimoaka, U. Chung, H. Chikuda, T. Yamada, M. Uchida, *et al.* (2005). Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage* 13 (7): 632-41.
- Kamekura, S., Y. Kawasaki, K. Hoshi, T. Shimoaka, H. Chikuda, Z. Maruyama, T. Komori, *et al.* (2006). Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum* 54 (8): 2462-70.
- Karsenty, G. (1999). The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev* 13 (23): 3037-51.
- Karsenty, G. (2008). Transcriptional control of skeletogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9: 183-96.
- Karsenty, G. and E.F. Wagner (2002). Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* 2 (4): 389-406.

- Kawamura, S., K. Lotito and A.R. Scott (2003). Biomechanics and healing response of the meniscus. *Operative Techniques in Sports Medicine* 11 (2): 68-76.
- Ke, Q. and M. Costa (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 70 (5): 1469-80.
- Kellner, K., G. Liebsch, I. Klimant, O.S. Wolfbeis, T. Blunk, M.B. Schulz and A. Gopferich (2002). Determination of oxygen gradients in engineered tissue using a fluorescent sensor. *Biotechnol Bioeng* 80 (1): 73-83.
- Kelly, D.J. and C.R. Jacobs (2010). The role of mechanical signals in regulating chondrogenesis and osteogenesis of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today* 90 (1): 75-85.
- Kiani, C., L. Chen, Y.J. Wu, A.J. Yee and B.B. Yang (2002). Structure and function of aggrecan. *Cell Res* 12 (1): 19-32.
- Kim, I.S., F. Otto, B. Zabel and S. Mundlos (1999). Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech Dev* 80 (2): 159-70.
- Kim, T.K. and R.G. Roeder (1994). Proline-rich activator CTF1 targets the TFIIB assembly step during transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (10): 4170-4.
- Kimura, H., A. Weisz, Y. Kurashima, K. Hashimoto, T. Ogura, F. D'Acquisto, R. Addeo, *et al.* (2000). Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* 95 (1): 189-97.
- Klug, W., M. Cummings and C. Spencer (2007). Genetik. Munich, Pearson Education Deutschland GmbH.
- Knauper, V., S. Cowell, B. Smith, C. Lopez-Otin, M. O'Shea, H. Morris, L. Zardi, *et al.* (1997). The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *J Biol Chem* 272 (12): 7608-16.
- Knauper, V., C. Lopez-Otin, B. Smith, G. Knight and G. Murphy (1996). Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 271 (3): 1544-50.
- Komori, T., H. Yagi, S. Nomura, A. Yamaguchi, K. Sasaki, K. Deguchi, Y. Shimizu, *et al.* (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89 (5): 755-64.
- Kosher, R.A., W.M. Kulyk and S.W. Gay (1986). Collagen gene expression during limb cartilage differentiation. *J Cell Biol* 102 (4): 1151-6.
- Krane, S.M. and M. Inada (2008). Matrix metalloproteinases and bone. *Bone* 43 (1): 7-18.
- Kuhn, K., D.D. D'Lima, S. Hashimoto and M. Lotz (2004). Cell death in cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 12 (1): 1-16.
- Kulyk, W.M., C.N. Coelho and R.A. Kosher (1991). Type IX collagen gene expression during limb cartilage differentiation. *Matrix* 11 (4): 282-8.
- Kulyk, W.M., B.J. Rodgers, K. Greer and R.A. Kosher (1989). Promotion of embryonic chick limb cartilage differentiation by transforming growth factor-beta. *Dev Biol* 135 (2): 424-30.
- Kwon, T.G., X. Zhao, Q. Yang, Y. Li, C. Ge, G. Zhao and R.T. Franceschi (2011). Physical and functional interactions between Runx2 and HIF-1alpha induce vascular endothelial growth factor gene expression. *J Cell Biochem* 112 (12): 3582-93.
- Kyostio-Moore, S., B. Nambiar, E. Hutto, P.J. Ewing, S. Piraino, P. Berthelette, C. Sookdeo, *et al.* (2011). STR/ort mice, a model for spontaneous osteoarthritis, exhibit elevated levels of both local and systemic inflammatory markers. *Comp Med* 61 (4): 346-55.
- Kypriotou, M., M. Fossard-Demoor, C. Chadjichristos, C. Ghayor, B. de Crombrughe, J.P. Pujol and P. Galera (2003). SOX9 exerts a bifunctional effect on type II collagen gene (COL2A1) expression in chondrocytes depending on the differentiation state. *DNA Cell Biol* 22 (2): 119-29.
- Lafont, J.E. (2010). Lack of oxygen in articular cartilage: consequences for chondrocyte biology. *Int J Exp Pathol* 91 (2): 99-106.

- Lamb, K.J., J.C. Lewthwaite, J.P. Lin, D. Simon, E. Kavanagh, C.P. Wheeler-Jones and A.A. Pitsillides (2003). Diverse range of fixed positional deformities and bone growth restraint provoked by flaccid paralysis in embryonic chicks. *Int J Exp Pathol* 84 (4): 191-9.
- Lanske, B., A.C. Karaplis, K. Lee, A. Luz, A. Vortkamp, A. Pirro, M. Karperien, *et al.* (1996). PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 273 (5275): 663-6.
- Lawrence, R.C., D.T. Felson, C.G. Helmick, L.M. Arnold, H. Choi, R.A. Deyo, S. Gabriel, *et al.* (2008). Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum* 58 (1): 26-35.
- Leboy, P.S., L. Vaias, B. Uschmann, E. Golub, S.L. Adams and M. Pacifici (1989). Ascorbic acid induces alkaline phosphatase, type X collagen, and calcium deposition in cultured chick chondrocytes. *J Biol Chem* 264 (29): 17281-6.
- Lee, A.S., M.B. Ellman, D. Yan, J.S. Kroin, B.J. Cole, A.J. van Wijnen and H.J. Im (2013). A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene* 527 (2): 440-7.
- Lefebvre, V., R.R. Behringer and B. de Crombrughe (2001). L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway. *Osteoarthritis Cartilage* 9 Suppl A: 69-75.
- Lefebvre, V. and P. Bhattaram (2010). Vertebrate skeletogenesis. *Curr Top Dev Biol* 90: 291-317.
- Lefebvre, V., W. Huang, V.R. Harley, P.N. Goodfellow and B. de Crombrughe (1997). SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol* 17 (4): 2336-46.
- Lefebvre, V., P. Li and B. de Crombrughe (1998). A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J* 17 (19): 5718-33.
- Lefebvre, V., K. Mukhopadhyay, G. Zhou, S. Garofalo, C. Smith, H. Eberspaecher, J.H. Kimura, *et al.* (1996a). A 47-bp sequence of the first intron of the mouse pro alpha 1(II) collagen gene is sufficient to direct chondrocyte Expression. *Ann N Y Acad Sci* 785: 284-7.
- Lefebvre, V. and P. Smits (2005). Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75 (3): 200-12.
- Lefebvre, V., G. Zhou, K. Mukhopadhyay, C.N. Smith, Z. Zhang, H. Eberspaecher, X. Zhou, *et al.* (1996b). An 18-base-pair sequence in the mouse proalpha1(II) collagen gene is sufficient for expression in cartilage and binds nuclear proteins that are selectively expressed in chondrocytes. *Mol Cell Biol* 16 (8): 4512-23.
- Lengner, C.J., M.Q. Hassan, R.W. Serra, C. Lepper, A.J. van Wijnen, J.L. Stein, J.B. Lian, *et al.* (2005). Nkx3.2-mediated repression of Runx2 promotes chondrogenic differentiation. *J Biol Chem* 280 (16): 15872-9.
- Linsenmayer, T.F., R.D. Eavey and T.M. Schmid (1988). Type X collagen: a hypertrophic cartilage-specific molecule. *Pathol Immunopathol Res* 7 (1-2): 14-9.
- Little, C.B., A. Barai, D. Burkhardt, S.M. Smith, A.J. Fosang, Z. Werb, M. Shah, *et al.* (2009). Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis Rheum* 60 (12): 3723-33.
- Liu, H., W. Xue, G. Ge, X. Luo, Y. Li, H. Xiang, X. Ding, *et al.* (2010). Hypoxic preconditioning advances CXCR4 and CXCR7 expression by activating HIF-1alpha in MSCs. *Biochem Biophys Res Commun* 401 (4): 509-15.
- Loeser, R.F. (2002). Integrins and cell signaling in chondrocytes. *Biorheology* 39 (1-2): 119-24.
- Loeser, R.F. (2010). Age-related changes in the musculoskeletal system and the development of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med* 26 (3): 371-86.
- Loeser, R.F., S.R. Goldring, C.R. Scanzello and M.B. Goldring (2012). Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* 64 (6): 1697-707.

- Mackie, E.J., Y.A. Ahmed, L. Tatarczuch, K.S. Chen and M. Mirams (2008). Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol* 40 (1): 46-62.
- Mallein-Gerin, F., R.A. Kosher, W.B. Upholt and M.L. Tanzer (1988). Temporal and spatial analysis of cartilage proteoglycan core protein gene expression during limb development by in situ hybridization. *Dev Biol* 126 (2): 337-45.
- Masson, N. and P.J. Ratcliffe (2003). HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O(2) levels. *J Cell Sci* 116 (Pt 15): 3041-9.
- Matsuo, M., K. Nishida, A. Yoshida, T. Murakami and H. Inoue (2001). Expression of caspase-3 and -9 relevant to cartilage destruction and chondrocyte apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Acta Med Okayama* 55 (6): 333-40.
- Matyas, J.R., M.E. Adams, D. Huang and L.J. Sandell (1995). Discoordinate gene expression of aggrecan and type II collagen in experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 38 (3): 420-5.
- Mayne, R. (1989). Cartilage collagens. What is their function, and are they involved in articular disease? *Arthritis Rheum* 32 (3): 241-6.
- Mengshol, J.A., M.P. Vincenti and C.E. Brinckerhoff (2001). IL-1 induces collagenase-3 (MMP-13) promoter activity in stably transfected chondrocytic cells: requirement for Runx-2 and activation by p38 MAPK and JNK pathways. *Nucleic Acids Res* 29 (21): 4361-72.
- Mengshol, J.A., M.P. Vincenti, C.I. Coon, A. Barchowsky and C.E. Brinckerhoff (2000). Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum* 43 (4): 801-11.
- Mercuri, F.A., R.A. Maciewicz, J. Tart, K. Last and A.J. Fosang (2000). Mutations in the interglobular domain of aggrecan alter matrix metalloproteinase and aggrecanase cleavage patterns. Evidence that matrix metalloproteinase cleavage interferes with aggrecanase activity. *J Biol Chem* 275 (42): 33038-45.
- Mermod, N., E.A. O'Neill, T.J. Kelly and R. Tjian (1989). The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-I is distinct from the replication and DNA binding domain. *Cell* 58 (4): 741-53.
- Merz, D., R. Liu, K. Johnson and R. Terkeltaub (2003). IL-8/CXCL8 and growth-related oncogene alpha/CXCL1 induce chondrocyte hypertrophic differentiation. *J Immunol* 171 (8): 4406-15.
- Michigami, T. (2013). Regulatory mechanisms for the development of growth plate cartilage. *Cell Mol Life Sci* 70 (22): 4213-21.
- Millward-Sadler, S.J. and D.M. Salter (2004). Integrin-dependent signal cascades in chondrocyte mechanotransduction. *Ann Biomed Eng* 32 (3): 435-46.
- Minina, E., C. Kreschel, M.C. Naski, D.M. Ornitz and A. Vortkamp (2002). Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev Cell* 3 (3): 439-49.
- Mitchell, P.G., H.A. Magna, L.M. Reeves, L.L. Lopresti-Morrow, S.A. Yocum, P.J. Rosner, K.F. Geoghegan, et al. (1996). Cloning, expression, and type II collagenolytic activity of matrix metalloproteinase-13 from human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 97 (3): 761-8.
- Mitchell, P.J., C. Wang and R. Tjian (1987). Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen. *Cell* 50 (6): 847-61.
- Mohibullah, N., A. Donner, J.A. Ippolito and T. Williams (1999). SELEX and missing phosphate contact analyses reveal flexibility within the AP-2[alpha] protein: DNA binding complex. *Nucleic Acids Res* 27 (13): 2760-9.
- Morgelin, M., M. Paulsson, T.E. Hardingham, D. Heinegard and J. Engel (1988). Cartilage proteoglycans. Assembly with hyaluronate and link protein as studied by electron microscopy. *Biochem J* 253 (1): 175-85.
- Moser, M., A.K. Bosserhoff, E.B. Hunziker, L. Sandell, R. Fassler and R. Buettner (2002). Ultrastructural cartilage abnormalities in MIA/CD-RAP-deficient mice. *Mol Cell Biol* 22 (5): 1438-45.

- Moser, M., A. Imhof, A. Pscherer, R. Bauer, W. Amselgruber, F. Sinowatz, F. Hofstadter, *et al.* (1995). Cloning and characterization of a second AP-2 transcription factor: AP-2 beta. *Development* 121 (9): 2779-88.
- Moser, M., A. Pscherer, C. Roth, J. Becker, G. Mucher, K. Zerres, C. Dixkens, *et al.* (1997b). Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor AP-2beta. *Genes Dev* 11 (15): 1938-48.
- Moser, M., J. Ruschoff and R. Buettner (1997a). Comparative analysis of AP-2 alpha and AP-2 beta gene expression during murine embryogenesis. *Dev Dyn* 208 (1): 115-24.
- Muir, H. (1995). The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *Bioessays* 17 (12): 1039-48.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-73.
- Murakami, S., G. Balmes, S. McKinney, Z. Zhang, D. Givol and B. de Crombrughe (2004). Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype. *Genes Dev* 18 (3): 290-305.
- Murata, M., K. Yudo, H. Nakamura, J. Chiba, K. Okamoto, N. Suematsu, K. Nishioka, *et al.* (2009). Hypoxia upregulates the expression of angiopoietin-like-4 in human articular chondrocytes: role of angiopoietin-like-4 in the expression of matrix metalloproteinases and cartilage degradation. *J Orthop Res* 27 (1): 50-7.
- Murphy, C.L. and J.M. Polak (2004). Control of human articular chondrocyte differentiation by reduced oxygen tension. *J Cell Physiol* 199 (3): 451-9.
- Murphy, L., T.A. Schwartz, C.G. Helmick, J.B. Renner, G. Tudor, G. Koch, A. Dragomir, *et al.* (2008). Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 59 (9): 1207-13.
- Nagase, H., R. Visse and G. Murphy (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69 (3): 562-73.
- Nah, H.D., B.J. Rodgers, W.M. Kulyk, B.E. Kream, R.A. Kosher and W.B. Upholt (1988). In situ hybridization analysis of the expression of the type II collagen gene in the developing chicken limb bud. *Coll Relat Res* 8 (4): 277-94.
- Neuhold, L.A., L. Killar, W. Zhao, M.L. Sung, L. Warner, J. Kulik, J. Turner, *et al.* (2001). Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *J Clin Invest* 107 (1): 35-44.
- Nicholson, D.W., A. Ali, N.A. Thornberry, J.P. Vaillancourt, C.K. Ding, M. Gallant, Y. Gareau, *et al.* (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376 (6535): 37-43.
- Niebler, S. and A.K. Bosserhoff (2013). The transcription factor activating enhancer-binding protein epsilon (AP-2epsilon) regulates the core promoter of type II collagen (COL2A1). *FEBS J* 280 (6): 1397-408.
- Nilsson, O., R. Marino, F. De Luca, M. Phillip and J. Baron (2005). Endocrine regulation of the growth plate. *Horm Res* 64 (4): 157-65.
- Nottoli, T., S. Hagopian-Donaldson, J. Zhang, A. Perkins and T. Williams (1998). AP-2-null cells disrupt morphogenesis of the eye, face, and limbs in chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (23): 13714-9.
- Nowlan, N.C., J. Sharpe, K.A. Roddy, P.J. Prendergast and P. Murphy (2010). Mechanobiology of embryonic skeletal development: Insights from animal models. *Birth Defects Res C Embryo Today* 90 (3): 203-13.
- Nurminskaya, M. and T.F. Linsenmayer (1996). Identification and characterization of up-regulated genes during chondrocyte hypertrophy. *Dev Dyn* 206 (3): 260-71.
- O'Connor, C.J., N. Case and F. Guilak (2013). Mechanical regulation of chondrogenesis. *Stem Cell Res Ther* 4 (4): 61.

- Oberlender, S.A. and R.S. Tuan (1994). Spatiotemporal profile of N-cadherin expression in the developing limb mesenchyme. *Cell Adhes Commun* 2 (6): 521-37.
- Ohkubo, K., H. Shimokawa, T. Ogawa, S. Suzuki, K. Fukada, K. Ohya and K. Ohyama (2003). Immunohistochemical localization of matrix metalloproteinase 13 (MMP-13) in mouse mandibular condylar cartilage. *J Med Dent Sci* 50 (3): 203-11.
- Olivotto, E., R. Vitellozzi, P. Fernandez, E. Falcieri, M. Battistelli, S. Burattini, A. Facchini, *et al.* (2007). Chondrocyte hypertrophy and apoptosis induced by GROalpha require three-dimensional interaction with the extracellular matrix and a co-receptor role of chondroitin sulfate and are associated with the mitochondrial splicing variant of cathepsin B. *J Cell Physiol* 210 (2): 417-27.
- Ornitz, D.M. (2005). FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine Growth Factor Rev* 16 (2): 205-13.
- Oshima, O., P.S. Leboy, S.A. McDonald, R.S. Tuan and I.M. Shapiro (1989). Developmental expression of genes in chick growth cartilage detected by in situ hybridization. *Calcif Tissue Int* 45 (3): 182-92.
- Otero, M., D.A. Plumb, K. Tsuchimochi, C.L. Dragomir, K. Hashimoto, H. Peng, E. Olivotto, *et al.* (2012). E74-like factor 3 (ELF3) impacts on matrix metalloproteinase 13 (MMP13) transcriptional control in articular chondrocytes under proinflammatory stress. *J Biol Chem* 287 (5): 3559-72.
- Otto, F., A.P. Thornell, T. Crompton, A. Denzel, K.C. Gilmour, I.R. Rosewell, G.W. Stamp, *et al.* (1997). Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89 (5): 765-71.
- Park, S.J., E.J. Cheon, M.H. Lee and H.A. Kim (2013). MicroRNA-127-5p Regulates Matrix Metalloproteinase 13 Expression and Interleukin-1beta-Induced Catabolic Effects in Human Chondrocytes. *Arthritis Rheum* 65 (12): 3141-52.
- Pendas, A.M., M. Balbin, E. Llano, M.G. Jimenez and C. Lopez-Otin (1997). Structural analysis and promoter characterization of the human collagenase-3 gene (MMP13). *Genomics* 40 (2): 222-33.
- Pfander, D., T. Cramer, E. Schipani and R.S. Johnson (2003). HIF-1alpha controls extracellular matrix synthesis by epiphyseal chondrocytes. *J Cell Sci* 116 (Pt 9): 1819-26.
- Pfander, D., B. Swoboda and T. Kirsch (2001). Expression of early and late differentiation markers (proliferating cell nuclear antigen, syndecan-3, annexin VI, and alkaline phosphatase) by human osteoarthritic chondrocytes. *Am J Pathol* 159 (5): 1777-83.
- Pitsillides, A.A. and F. Beier (2011). Cartilage biology in osteoarthritis--lessons from developmental biology. *Nat Rev Rheumatol* 7 (11): 654-63.
- Pizette, S. and L. Niswander (2000). BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. *Dev Biol* 219 (2): 237-49.
- Pozgan, U., D. Caglic, B. Rozman, H. Nagase, V. Turk and B. Turk (2010). Expression and activity profiling of selected cysteine cathepsins and matrix metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biol Chem* 391 (5): 571-9.
- Pritzker, K.P., S. Gay, S.A. Jimenez, K. Ostergaard, J.P. Pelletier, P.A. Revell, D. Salter, *et al.* (2006). Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage* 14 (1): 13-29.
- Provot, S., D. Zinyk, Y. Gunes, R. Kathri, Q. Le, H.M. Kronenberg, R.S. Johnson, *et al.* (2007). Hif-1alpha regulates differentiation of limb bud mesenchyme and joint development. *J Cell Biol* 177 (3): 451-64.
- Puetzer, J., J. Williams, A. Gillies, S. Bernacki and E.G. Lobo (2013). The effects of cyclic hydrostatic pressure on chondrogenesis and viability of human adipose- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in three-dimensional agarose constructs. *Tissue Eng Part A* 19 (1-2): 299-306.

- Pulai, J.I., H. Chen, H.J. Im, S. Kumar, C. Hanning, P.S. Hegde and R.F. Loeser (2005). NF-kappa B mediates the stimulation of cytokine and chemokine expression by human articular chondrocytes in response to fibronectin fragments. *J Immunol* 174 (9): 5781-8.
- Pulsatelli, L., O. Addimanda, V. Brusi, B. Pavloska and R. Meliconi (2013). New findings in osteoarthritis pathogenesis: therapeutic implications. *Ther Adv Chronic Dis* 4 (1): 23-43.
- Ra, H.J. and W.C. Parks (2007). Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol* 26 (8): 587-96.
- Ramage, L., G. Nuki and D.M. Salter (2009). Signalling cascades in mechanotransduction: cell-matrix interactions and mechanical loading. *Scand J Med Sci Sports* 19 (4): 457-69.
- Reboul, P., J.P. Pelletier, G. Tardif, J.M. Cloutier and J. Martel-Pelletier (1996). The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J Clin Invest* 97 (9): 2011-9.
- Reichenberger, E., T. Aigner, K. von der Mark, H. Stoss and W. Bertling (1991). In situ hybridization studies on the expression of type X collagen in fetal human cartilage. *Dev Biol* 148 (2): 562-72.
- Ren, H., Y. Cao, Q. Zhao, J. Li, C. Zhou, L. Liao, M. Jia, *et al.* (2006). Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 347 (1): 12-21.
- Responte, D.J., J.K. Lee, J.C. Hu and K.A. Athanasiou (2012). Biomechanics-driven chondrogenesis: from embryo to adult. *FASEB J* 26 (9): 3614-24.
- Riddle, R.D., R.L. Johnson, E. Laufer and C. Tabin (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75 (7): 1401-16.
- Roach, H.I., T. Aigner and J.B. Kouri (2004). Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis* 9 (3): 265-77.
- Roach, H.I. and N.M. Clarke (2000). Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. *J Bone Joint Surg Br* 82 (4): 601-13.
- Roach, H.I., N. Yamada, K.S. Cheung, S. Tilley, N.M. Clarke, R.O. Oreffo, S. Kokubun, *et al.* (2005). Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. *Arthritis Rheum* 52 (10): 3110-24.
- Roark, E.F. and K. Greer (1994). Transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein-2 act by distinct mechanisms to promote chick limb cartilage differentiation in vitro. *Dev Dyn* 200 (2): 103-16.
- Robins, J.C., N. Akeno, A. Mukherjee, R.R. Dalal, B.J. Aronow, P. Koopman and T.L. Clemens (2005). Hypoxia induces chondrocyte-specific gene expression in mesenchymal cells in association with transcriptional activation of Sox9. *Bone* 37 (3): 313-22.
- Rock, J.R., M.C. Lopez, H.V. Baker and B.D. Harfe (2007). Identification of genes expressed in the mouse limb using a novel ZPA microarray approach. *Gene Expr Patterns* 8 (1): 19-26.
- Roddy, K.A., P.J. Prendergast and P. Murphy (2011). Mechanical influences on morphogenesis of the knee joint revealed through morphological, molecular and computational analysis of immobilised embryos. *PLoS One* 6 (2): e17526.
- Roth, C., M. Schuierer, K. Gunther and R. Buettner (2000). Genomic structure and DNA binding properties of the human zinc finger transcriptional repressor AP-2rep (KLF12). *Genomics* 63 (3): 384-90.
- Roughley, P.J. (2006). The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur Cell Mater* 12: 92-101.
- Sahebjam, S., R. Khokha and J.S. Mort (2007). Increased collagen and aggrecan degradation with age in the joints of Timp3(-/-) mice. *Arthritis Rheum* 56 (3): 905-9.
- Saito, D., S. Yonei-Tamura, Y. Takahashi and K. Tamura (2006). Level-specific role of paraxial mesoderm in regulation of Tbx5/Tbx4 expression and limb initiation. *Dev Biol* 292 (1): 79-89.

- Saito, T., A. Fukai, A. Mabuchi, T. Ikeda, F. Yano, S. Ohba, N. Nishida, *et al.* (2010). Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2 α during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med* 16 (6): 678-86.
- Sandmeyer, S., B. Gallis and P. Bornstein (1981). Coordinate transcriptional regulation of type I procollagen genes by Rous sarcoma virus. *J Biol Chem* 256 (10): 5022-8.
- Scheibler, T.H. and W. Schmidt (2003). Anatomie. Berlin, Springer-Verlag.
- Schipani, E. (2005). Hypoxia and HIF-1 α in chondrogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 16 (4-5): 539-46.
- Schipani, E., H.E. Ryan, S. Didrickson, T. Kobayashi, M. Knight and R.S. Johnson (2001). Hypoxia in cartilage: HIF-1 α is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev* 15 (21): 2865-76.
- Schmid, R. and A.K. Bosserhoff (2014). Redundancy in regulation of chondrogenesis in MIA/CD-RAP-deficient mice. *Mech Dev* 131: 24-34.
- Schmid, R., S. Schiffner, A. Opolka, S. Grassel, T. Schubert, M. Moser and A.K. Bosserhoff (2010). Enhanced cartilage regeneration in MIA/CD-RAP deficient mice. *Cell Death Dis* 1: e97.
- Schmid, T.M. and T.F. Linsenmayer (1983). A short chain (pro)collagen from aged endochondral chondrocytes. Biochemical characterization. *J Biol Chem* 258 (15): 9504-9.
- Schmidl, M., N. Adam, C. Surmann-Schmitt, T. Hattori, M. Stock, U. Dietz, B. de Crombrughe, *et al.* (2006). Twisted gastrulation modulates bone morphogenetic protein-induced collagen II and X expression in chondrocytes in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 281 (42): 31790-800.
- Schorle, H., P. Meier, M. Buchert, R. Jaenisch and P.J. Mitchell (1996). Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature* 381 (6579): 235-8.
- Schumann, D., R. Kujat, J. Zellner, M.K. Angele, M. Nerlich, E. Mayr and P. Angele (2006). Treatment of human mesenchymal stem cells with pulsed low intensity ultrasound enhances the chondrogenic phenotype in vitro. *Biorheology* 43 (3-4): 431-43.
- Searls, R.L., S.R. Hilfer and S.M. Mirow (1972). An ultrastructural study of early chondrogenesis in the chick wing bud. *Dev Biol* 28 (1): 123-37.
- Sekiya, I., K. Tsuji, P. Koopman, H. Watanabe, Y. Yamada, K. Shinomiya, A. Nifuji, *et al.* (2000). SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J Biol Chem* 275 (15): 10738-44.
- Shao, Y.Y., L. Wang and R.T. Ballock (2006). Thyroid hormone and the growth plate. *Rev Endocr Metab Disord* 7 (4): 265-71.
- Sharif, M., A. Whitehouse, P. Sharman, M. Perry and M. Adams (2004). Increased apoptosis in human osteoarthritic cartilage corresponds to reduced cell density and expression of caspase-3. *Arthritis Rheum* 50 (2): 507-15.
- Shen, G. (2005). The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthod Craniofac Res* 8 (1): 11-7.
- Shinomura, T., K. Kimata, Y. Oike, N. Maeda, S. Yano and S. Suzuki (1984). Appearance of distinct types of proteoglycan in a well-defined temporal and spatial pattern during early cartilage formation in the chick limb. *Dev Biol* 103 (1): 211-20.
- Shlopov, B.V., M.L. Gumanovskaya and K.A. Hasty (2000). Autocrine regulation of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) during osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 43 (1): 195-205.
- Shlopov, B.V., W.R. Lie, C.L. Mainardi, A.A. Cole, S. Chubinskaya and K.A. Hasty (1997). Osteoarthritic lesions: involvement of three different collagenases. *Arthritis Rheum* 40 (11): 2065-74.
- Silver, I.A. (1975). Measurement of pH and ionic composition of pericellular sites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 271 (912): 261-72.
- Singer, II, D.W. Kawka, E.K. Bayne, S.A. Donatelli, J.R. Weidner, H.R. Williams, J.M. Ayala, *et al.* (1995). VDIPEN, a metalloproteinase-generated neopeptide, is induced and immunolocalized in articular cartilage during inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 95 (5): 2178-86.

- Smits, P., P. Li, J. Mandel, Z. Zhang, J.M. Deng, R.R. Behringer, B. de Crombrughe, *et al.* (2001). The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell* 1 (2): 277-90.
- Spranger, J. (2006). Skeletal dysplasias. In: *Human Malformations and Related Anomalies*. R.E. Stevenson and J.G. Hall. Oxford, New York, Oxford University Press. 2.
- Stahle-Backdahl, M., B. Sandstedt, K. Bruce, A. Lindahl, M.G. Jimenez, J.A. Vega and C. Lopez-Otin (1997). Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 76 (5): 717-28.
- Staines, K.A., V.E. Macrae and C. Farquharson (2012). Cartilage development and degeneration: a Wnt Wnt situation. *Cell Biochem Funct* 30 (8): 633-42.
- Staines, K.A., A.S. Pollard, I.M. McGonnell, C. Farquharson and A.A. Pitsillides (2013). Cartilage to bone transitions in health and disease. *J Endocrinol* 219 (1): R1-R12.
- Stanton, H., F.M. Rogerson, C.J. East, S.B. Golub, K.E. Lawlor, C.T. Meeker, C.B. Little, *et al.* (2005). ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* 434 (7033): 648-52.
- Stanton, L.A., S. Sabari, A.V. Sampaio, T.M. Underhill and F. Beier (2004). p38 MAP kinase signalling is required for hypertrophic chondrocyte differentiation. *Biochem J* 378 (Pt 1): 53-62.
- Stephens, M., A.P. Kwan, M.T. Bayliss and C.W. Archer (1992). Human articular surface chondrocytes initiate alkaline phosphatase and type X collagen synthesis in suspension culture. *J Cell Sci* 103 (Pt 4): 1111-6.
- Stickens, D., D.J. Behonick, N. Ortega, B. Heyer, B. Hartenstein, Y. Yu, A.J. Fosang, *et al.* (2004). Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development* 131 (23): 5883-95.
- Stockwell, R.A. (1979). *Biology of Cartilage Cells*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Studer, D., C. Millan, E. Ozturk, K. Maniura-Weber and M. Zenobi-Wong (2012). Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* 24: 118-35.
- Sulzbacher, I. (2013). Osteoarthritis: histology and pathogenesis. *Wien Med Wochenschr* 163 (9-10): 212-9.
- Summerbell, D. and L. Wolpert (1972). Cell density and cell division in the early morphogenesis of the chick wing. *Nat New Biol* 239 (88): 24-6.
- Sunk, I.G., S. Trattng, W.B. Graninger, L. Amoyo, B. Tuerk, C.W. Steiner, J.S. Smolen, *et al.* (2006). Impairment of chondrocyte biosynthetic activity by exposure to 3-tesla high-field magnetic resonance imaging is temporary. *Arthritis Res Ther* 8 (4): R106.
- Swann, D.A., H.S. Slayter and F.H. Silver (1981). The molecular structure of lubricating glycoprotein-I, the boundary lubricant for articular cartilage. *J Biol Chem* 256 (11): 5921-5.
- Swiderski, R.E. and M. Solorsh (1992). Localization of type II collagen, long form alpha 1(IX) collagen, and short form alpha 1(IX) collagen transcripts in the developing chick notochord and axial skeleton. *Dev Dyn* 194 (2): 118-27.
- Taher, L., N.M. Collette, D. Murugesh, E. Maxwell, I. Ovcharenko and G.G. Loots (2011). Global gene expression analysis of murine limb development. *PLoS One* 6 (12): e28358.
- Takada, Y., T. Kamata, A. Irie, W. Puzon-McLaughlin and X.P. Zhang (1997). Structural basis of integrin-mediated signal transduction. *Matrix Biol* 16 (4): 143-51.
- Takahashi, I., G.H. Nuckolls, K. Takahashi, O. Tanaka, I. Semba, R. Dashner, L. Shum, *et al.* (1998). Compressive force promotes sox9, type II collagen and aggrecan and inhibits IL-1beta expression resulting in chondrogenesis in mouse embryonic limb bud mesenchymal cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 14): 2067-76.
- Takeda, S., J.P. Bonnamy, M.J. Owen, P. Ducy and G. Karsenty (2001). Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev* 15 (4): 467-81.

- Tamamura, Y., T. Otani, N. Kanatani, E. Koyama, J. Kitagaki, T. Komori, Y. Yamada, *et al.* (2005). Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. *J Biol Chem* 280 (19): 19185-95.
- Tan, L., H. Peng, M. Osaki, B.K. Choy, P.E. Auron, L.J. Sandell and M.B. Goldring (2003). Egr-1 mediates transcriptional repression of COL2A1 promoter activity by interleukin-1beta. *J Biol Chem* 278 (20): 17688-700.
- Tardif, G., D. Hum, J.P. Pelletier, N. Duval and J. Martel-Pelletier (2009). Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human osteoarthritic chondrocytes. *BMC Musculoskelet Disord* 10: 148.
- Tardif, G., J.P. Pelletier, M. Dupuis, C. Geng, J.M. Cloutier and J. Martel-Pelletier (1999). Collagenase 3 production by human osteoarthritic chondrocytes in response to growth factors and cytokines is a function of the physiologic state of the cells. *Arthritis Rheum* 42 (6): 1147-58.
- Tardif, G., J.P. Pelletier, M. Dupuis, J.E. Hambor and J. Martel-Pelletier (1997). Cloning, sequencing and characterization of the 5'-flanking region of the human collagenase-3 gene. *Biochem J* 323 (Pt 1): 13-6.
- Tatzel, J., I. Poser, J. Schroeder and A.K. Bosserhoff (2005). Inhibition of melanoma inhibitory activity (MIA) expression in melanoma cells leads to molecular and phenotypic changes. *Pigment Cell Res* 18 (2): 92-101.
- Teif, V.B. and K. Rippe (2010). Statistical-mechanical lattice models for protein-DNA binding in chromatin. *J Phys Condens Matter* 22 (41): 414105.
- Tetlow, L.C., D.J. Adlam and D.E. Woolley (2001). Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum* 44 (3): 585-94.
- Thoms, B.L., K.A. Dudek, J.E. Lafont and C.L. Murphy (2013). Hypoxia promotes the production and inhibits the destruction of human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 65 (5): 1302-12.
- Thorogood, P.V. and J.R. Hinchliffe (1975). An analysis of the condensation process during chondrogenesis in the embryonic chick hind limb. *J Embryol Exp Morphol* 33 (3): 581-606.
- Tickle, C. (2003). Patterning systems--from one end of the limb to the other. *Dev Cell* 4 (4): 449-58.
- Tickle, C. and H. Barker (2013). The Sonic hedgehog gradient in the developing limb. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2 (2): 275-90.
- Tickle, C. and A. Munsterberg (2001). Vertebrate limb development--the early stages in chick and mouse. *Curr Opin Genet Dev* 11 (4): 476-81.
- Torres, L., D.D. Dunlop, C. Peterfy, A. Guermazi, P. Prasad, K.W. Hayes, J. Song, *et al.* (2006). The relationship between specific tissue lesions and pain severity in persons with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 14 (10): 1033-40.
- Tuli, R., S. Tuli, S. Nandi, X. Huang, P.A. Manner, W.J. Hozack, K.G. Danielson, *et al.* (2003). Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J Biol Chem* 278 (42): 41227-36.
- Tummala, R., R.A. Romano, E. Fuchs and S. Sinha (2003). Molecular cloning and characterization of AP-2 epsilon, a fifth member of the AP-2 family. *Gene* 321: 93-102.
- van der Kraan, P.M. and W.B. van den Berg (2012). Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthritis Cartilage* 20 (3): 223-32.
- von der Mark, K., T. Kirsch, A. Nerlich, A. Kuss, G. Weseloh, K. Gluckert and H. Stoss (1992). Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum* 35 (7): 806-11.
- Vortkamp, A., K. Lee, B. Lanske, G.V. Segre, H.M. Kronenberg and C.J. Tabin (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273 (5275): 613-22.

- Wanek, N., K. Muneoka, G. Holler-Dinsmore, R. Burton and S.V. Bryant (1989). A staging system for mouse limb development. *J Exp Zool* 249 (1): 41-9.
- Wang, F. and Y. Zhu (2011). Aquaporin-1: a potential membrane channel for facilitating the adaptability of rabbit nucleus pulposus cells to an extracellular matrix environment. *J Orthop Sci* 16 (3): 304-12.
- Wang, G.L., B.H. Jiang, E.A. Rue and G.L. Semenza (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (12): 5510-4.
- Wang, H.V., K. Vaupel, R. Buettner, A.K. Bosserhoff and M. Moser (2004). Identification and embryonic expression of a new AP-2 transcription factor, AP-2 epsilon. *Dev Dyn* 231 (1): 128-35.
- Wang, M., E.R. Sampson, H. Jin, J. Li, Q.H. Ke, H.J. Im and D. Chen (2013). MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 15 (1): R5.
- Wang, X., P.A. Manner, A. Horner, L. Shum, R.S. Tuan and G.H. Nuckolls (2004). Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 12 (12): 963-73.
- Wankhade, S., Y. Yu, J. Weinberg, M.A. Tainsky and P. Kannan (2000). Characterization of the activation domains of AP-2 family transcription factors. *J Biol Chem* 275 (38): 29701-8.
- Weise, M., S. De-Levi, K.M. Barnes, R.I. Gafni, V. Abad and J. Baron (2001). Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (12): 6871-6.
- Weiss, S., T. Hennig, R. Bock, E. Steck and W. Richter (2010). Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 223 (1): 84-93.
- Wenke, A.K. and A.K. Bosserhoff (2010). Roles of AP-2 transcription factors in the regulation of cartilage and skeletal development. *FEBS J* 277 (4): 894-902.
- Wenke, A.K., S. Grassel, M. Moser and A.K. Bosserhoff (2009). The cartilage-specific transcription factor Sox9 regulates AP-2epsilon expression in chondrocytes. *FEBS J* 276 (9): 2494-504.
- Wenke, A.K., S. Niebler, S. Grassel and A.K. Bosserhoff (2011). The transcription factor AP-2varepsilon regulates CXCL1 during cartilage development and in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 19 (2): 206-12.
- Wenke, A.K., T. Rothhammer, M. Moser and A.K. Bosserhoff (2006). Regulation of integrin alpha10 expression in chondrocytes by the transcription factors AP-2epsilon and Ets-1. *Biochem Biophys Res Commun* 345 (1): 495-501.
- Werling, U. and H. Schorle (2002). Transcription factor gene AP-2 gamma essential for early murine development. *Mol Cell Biol* 22 (9): 3149-56.
- Widelitz, R.B., T.X. Jiang, B.A. Murray and C.M. Chuong (1993). Adhesion molecules in skeletogenesis: II. Neural cell adhesion molecules mediate precartilaginous mesenchymal condensations and enhance chondrogenesis. *J Cell Physiol* 156 (2): 399-411.
- Williams, T., A. Admon, B. Luscher and R. Tjian (1988). Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. *Genes Dev* 2 (12A): 1557-69.
- Williams, T. and R. Tjian (1991). Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes Dev* 5 (4): 670-82.
- Williamson, J.A., J.M. Boshier, A. Skinner, D. Sheer, T. Williams and H.C. Hurst (1996). Chromosomal mapping of the human and mouse homologues of two new members of the AP-2 family of transcription factors. *Genomics* 35 (1): 262-4.
- Woo, K.J., T.J. Lee, J.W. Park and T.K. Kwon (2006). Desferrioxamine, an iron chelator, enhances HIF-1alpha accumulation via cyclooxygenase-2 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 343 (1): 8-14.

- Wright, E., M.R. Hargrave, J. Christiansen, L. Cooper, J. Kun, T. Evans, U. Gangadharan, *et al.* (1995). The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet* 9 (1): 15-20.
- Wuelling, M. and A. Vortkamp (2010). Transcriptional networks controlling chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification. *Pediatr Nephrol* 25 (4): 625-31.
- Wuelling, M. and A. Vortkamp (2011). Chondrocyte proliferation and differentiation. *Endocr Dev* 21: 1-11.
- Wuthier, R.E. and T.C. Register (1995). Role of alkaline phosphatase, a polyfunctional enzyme, in mineralizing tissues. In: *The Chemistry and Biology of Mineralized Tissue*. W.T. Butler. Birmingham, Ebsco Media, Inc.: 113-24.
- Xie, W.F., X. Zhang, S. Sakano, V. Lefebvre and L.J. Sandell (1999). Trans-activation of the mouse cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein gene by Sox9. *J Bone Miner Res* 14 (5): 757-63.
- Xu, L., H. Peng, D. Wu, K. Hu, M.B. Goldring, B.R. Olsen and Y. Li (2005). Activation of the discoidin domain receptor 2 induces expression of matrix metalloproteinase 13 associated with osteoarthritis in mice. *J Biol Chem* 280 (1): 548-55.
- Yagi, R., L.F. Chen, K. Shigesada, Y. Murakami and Y. Ito (1999). A WW domain-containing yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator. *EMBO J* 18 (9): 2551-62.
- Yamashita, S., M. Andoh, H. Ueno-Kudoh, T. Sato, S. Miyaki and H. Asahara (2009). Sox9 directly promotes Bapx1 gene expression to repress Runx2 in chondrocytes. *Exp Cell Res* 315 (13): 2231-40.
- Yang, S., J. Kim, J.H. Ryu, H. Oh, C.H. Chun, B.J. Kim, B.H. Min, *et al.* (2010). Hypoxia-inducible factor-2alpha is a catabolic regulator of osteoarthritic cartilage destruction. *Nat Med* 16 (6): 687-93.
- Yang, X., L. Chen, X. Xu, C. Li, C. Huang and C.X. Deng (2001). TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic differentiation and are required for maintaining articular cartilage. *J Cell Biol* 153 (1): 35-46.
- Yang, Y., G. Drossopoulou, P.T. Chuang, D. Duprez, E. Marti, D. Bumcrot, N. Vargesson, *et al.* (1997). Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development* 124 (21): 4393-404.
- Yoon, B.S. and K.M. Lyons (2004). Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *J Cell Biochem* 93 (1): 93-103.
- Yudoh, K., H. Nakamura, K. Masuko-Hongo, T. Kato and K. Nishioka (2005). Catabolic stress induces expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha in articular chondrocytes: involvement of HIF-1 alpha in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 7 (4): R904-14.
- Yun, K. and S.H. Im (2007). Transcriptional regulation of MMP13 by Lef1 in chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 364 (4): 1009-14.
- Zelzer, E., D.J. Glotzer, C. Hartmann, D. Thomas, N. Fukai, S. Soker and B.R. Olsen (2001). Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mech Dev* 106 (1-2): 97-106.
- Zelzer, E., R. Mamluk, N. Ferrara, R.S. Johnson, E. Schipani and B.R. Olsen (2004). VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development* 131 (9): 2161-71.
- Zemmyo, M., E.J. Meharra, K. Kuhn, L. Creighton-Achermann and M. Lotz (2003). Accelerated, aging-dependent development of osteoarthritis in alpha1 integrin-deficient mice. *Arthritis Rheum* 48 (10): 2873-80.
- Zhang, C., F. Yang, R. Cornelia, W. Tang, S. Swisher and H. Kim (2011). Hypoxia-inducible factor-1 is a positive regulator of Sox9 activity in femoral head osteonecrosis. *Bone* 48 (3): 507-13.
- Zhang, H., C.C. Wong, H. Wei, D.M. Gilkes, P. Korangath, P. Chaturvedi, L. Schito, *et al.* (2012). HIF-1-dependent expression of angiopoietin-like 4 and L1CAM mediates vascular metastasis of hypoxic breast cancer cells to the lungs. *Oncogene* 31 (14): 1757-70.

- Zhang, J., S. Hagopian-Donaldson, G. Serbedzija, J. Elsemore, D. Plehn-Dujowich, A.P. McMahon, R.A. Flavell, *et al.* (1996). Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature* 381 (6579): 238-41.
- Zhao, F., A.K. Bosserhoff, R. Buettner and M. Moser (2011). A heart-hand syndrome gene: Tfap2b plays a critical role in the development and remodeling of mouse ductus arteriosus and limb patterning. *PLoS One* 6 (7): e22908.
- Zhao, F., M. Satoda, J.D. Licht, Y. Hayashizaki and B.D. Gelb (2001). Cloning and characterization of a novel mouse AP-2 transcription factor, AP-2delta, with unique DNA binding and transactivation properties. *J Biol Chem* 276 (44): 40755-60.
- Zhao, Q., H. Eberspaecher, V. Lefebvre and B. De Crombrughe (1997). Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev Dyn* 209 (4): 377-86.
- Zheng, Q., G. Zhou, R. Morello, Y. Chen, X. Garcia-Rojas and B. Lee (2003). Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo. *J Cell Biol* 162 (5): 833-42.
- Zhou, G., S. Garofalo, K. Mukhopadhyay, V. Lefebvre, C.N. Smith, H. Eberspaecher and B. de Crombrughe (1995). A 182 bp fragment of the mouse pro alpha 1(II) collagen gene is sufficient to direct chondrocyte expression in transgenic mice. *J Cell Sci* 108 (Pt 12): 3677-84.
- Zhou, G., V. Lefebvre, Z. Zhang, H. Eberspaecher and B. de Crombrughe (1998). Three high mobility group-like sequences within a 48-base pair enhancer of the Col2a1 gene are required for cartilage-specific expression in vivo. *J Biol Chem* 273 (24): 14989-97.
- Zhou, G., Q. Zheng, F. Engin, E. Munivez, Y. Chen, E. Sebald, D. Krakow, *et al.* (2006). Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (50): 19004-9.
- Zhou, S., Z. Cui and J.P. Urban (2004). Factors influencing the oxygen concentration gradient from the synovial surface of articular cartilage to the cartilage-bone interface: a modeling study. *Arthritis Rheum* 50 (12): 3915-24.
- Zhu, P., Y.Y. Goh, H.F. Chin, S. Kersten and N.S. Tan (2012). Angiopoietin-like 4: a decade of research. *Biosci Rep* 32 (3): 211-9.

7 Eigene Publikationen

Wenke, A.K., **S. Niebler**, S. Grässel and A.K. Bosserhoff (**2011**). The transcription factor AP-2 epsilon regulates CXCL1 during cartilage development and in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 19 (2): 206-12.

Niebler, S. and A.K. Bosserhoff (**2013**). The transcription factor activating enhancer-binding protein epsilon (AP-2 epsilon) regulates the core promoter of type II collagen (COL2A1). *FEBS J* 280 (6): 1397-408.

Niebler, S., T. Schubert, E. Hunziker and A.K. Bosserhoff. Enhanced osteoarthritis development and Mmp13 expression in AP-2 ϵ -deficient mice. (zur Veröffentlichung eingereicht; in Revision)

Niebler, S., P. Angele, R. Kujat and A.K. Bosserhoff. Hypoxia-inducible factor 1 is responsible for the up-regulation of the transcription factor activating protein 2 epsilon during limb development. (zur Veröffentlichung eingereicht)